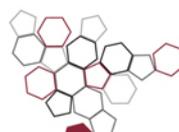




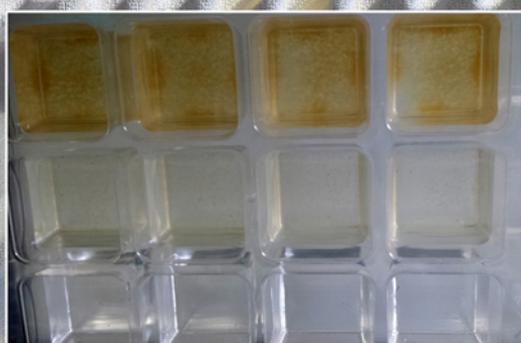
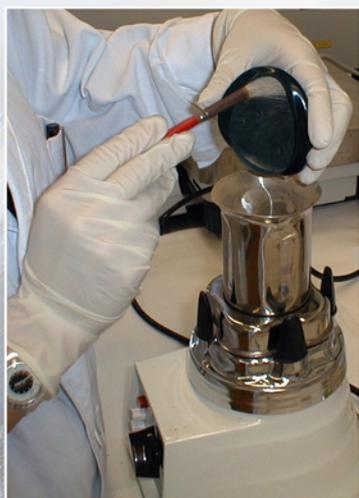
ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

Rassegna dei Confronti interlaboratorio in ambito ecotossicologico: l'esperienza di ISPRA (2003-2016)



276/2017

RA P P O R T I



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

Rassegna dei Confronti interlaboratorio in ambito ecotossicologico: l'esperienza di ISPRA (2003-2016)

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), le Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA) e le persone che agiscono per loro conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Rapporti **R 276/17**
ISBN **978-88-448-0874-7**

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica
ISPRA

Grafica di copertina: Franco Iozzoli
Foto di copertina: Elisa Raso, Franco Iozzoli

Coordinamento pubblicazione online:
Daria Mazzella
ISPRA – Area Comunicazione

Autori

Maria Gabriella Simeone^a, Elisa Raso^a, Stefania Balzamo^a, Daniela Conti^a, Sabrina Barbizzi^a : ^a (ISPRA).

Referee

Paolo de Zorzi (ISPRA)

Ringraziamenti

Questa pubblicazione è frutto delle attività lavorative maturate in seno ai progetti di ISPRA che hanno visto la partecipazione di (in ordine alfabetico): *Stefania Balzamo^a, Sabrina Barbizzi^a, Renato Baudo, Maria Belli, Vanessa Bellaria^a, Monica Beltrami (CNR- Verbania), Monica Buchetti^a, Fabio Cadoni^a, Damiano Centioli^a, Daniela Conti^a, Paolo de Zorzi^a, Teresa Guagnini^a, Cecilia La Marca (ISPRA), Cristina Martone^a, Renzo Mufato (ARPA Veneto), Alessandra Pati^a, Elisa Raso^a, Silvia Rosamilia^a, Giuseppe Sartori (ARPA Veneto), Alfonso Sbalchiero, Maria Gabriella Simeone^a, Giulia Stocchero (ARPA, Veneto).*

^a : (ISPRA)

INDICE

PREMESSA.....	6
ACRONIMI.....	7
TERMINI E DEFINIZIONI.....	8
1. INTRODUZIONE.....	10
2. SCHEMA DI ORGANIZZAZIONE DELLE PROVE VALUTATIVE INTERLABORATORIO.....	11
3. PANORAMICA DEGLI ESERCIZI PRESENTATI.....	14
4. TEST DI TOSSICITÀ ACUTA CON DAPHNIA MAGNA – ANNO 2003.....	17
4.1 Materiali.....	17
4.2 Disegno sperimentale.....	18
4.2.1 Criteri di validità.....	19
4.2.2 Registrazione dei risultati.....	19
4.3 Elaborazione statistica dei risultati.....	19
4.4 Risultati.....	19
4.4.1 Schiusa degli ephippi.....	20
4.4.2 Prova 1 – Test di controllo di qualità dell’acqua pura.....	21
4.4.3 Prova 2 – Test con dicromato di potassio.....	22
4.5 Considerazioni conclusive.....	29
4.6 Riferimenti.....	29
5. “APAT IC006” TEST DI TOSSICITÀ ACUTA CON DAPHNIA MAGNA.....	30
5.1 Materiali.....	30
5.2 Disegno sperimentale.....	31
5.3 Test di tossicità acuta 24 ore con Daphnia magna.....	32
5.3.1 Principio del saggio.....	32
5.3.2 Organismi.....	32
5.3.3 Restituzione dei risultati.....	33
5.4 Elaborazione statistica dei risultati.....	33
5.5 Risultati.....	35
5.5.1 Risultati dei L_{KIT}	36
5.5.2 Risultati dei L_{AL}	44
5.5.3 Confronto dei risultati ottenuti nelle prove con tossico cieco e tossico di riferimento per il kit e l’allevamento.....	52
5.5.4 Scarto tipo di ripetibilità e scarto tipo di riproducibilità dei metodi utilizzati nel circuito.....	53
5.5.4 Confronto tra i valori medi di EC_{50-24} h ottenuti con metodi diversi.....	55
5.6 Conclusioni.....	55
5.7 Riferimenti.....	56
5.8 Allegati.....	56
6. “APAT-IC012” Parametri chimici ed ecotossicologici su lisciviato ottenuto da una matrice solida (rifiuto – suolo contaminato).....	65
6.1 Materiali.....	65
6.2 Disegno sperimentale.....	66
6.3 Test di tossicità acuta (24 h) con <i>Daphnia magna</i>	67
6.3.1 Principio del saggio.....	67
6.3.2 Organismi.....	67
6.3.3 Acqua di diluzione e mantenimento degli organismi.....	68
6.3.4 Prova di lisciviazione di APAT RM015.....	68
6.3.5 Prove di tossicità con lisciviato di APAT RM015 e con il tossico di riferimento.....	68

6.3.6	6.3.6 Criteri di validità dei saggi di tossicità.....	69
6.3.7	6.3.7 Restituzione dei risultati.....	69
6.4	6.4 Elaborazione statistica dei risultati.....	69
6.5	6.5 Risultati.....	69
6.6	6.6 Conclusioni.....	76
6.7	6.7 Riferimenti.....	76
7.	7. “ISPRA-IC020” Valutazione ecotossicologica di contaminazione delle acque mediante saggi di tossicità acuta con <i>Vibrio fischeri</i>	78
7.1	7.1 Materiali.....	78
7.2	7.2 Disegno sperimentale.....	79
7.3	7.3 Saggio di inibizione della bioluminescenza con <i>Vibrio fischeri</i>	80
7.3.1	7.3.1 Principio del saggio.....	80
7.3.2	7.3.2 Organismi.....	80
7.3.3	7.3.3 Modalità di esecuzione della prova.....	80
7.3.4	7.3.4 Criteri di validità dei saggi.....	80
7.4	7.4 Elaborazione statistica dei risultati.....	80
7.5	7.5 Risultati.....	81
7.6	7.6 Analisi dei risultati.....	85
7.7	7.7 Conclusioni.....	86
7.8	7.8 Riferimenti.....	87
8.	8. ISPRA SC007 Studio collaborativo ecotossicologico su lisciviato di rifiuto mediante saggi con <i>pseudokirchneriella subcapitata</i> e <i>Daphnia magna</i>	88
8.1	8.1 Materiali.....	88
8.1.1	8.1.1 Prove di omogeneità del materiale di riferimento RM050.....	89
8.2	8.2 Disegno sperimentale.....	90
8.2.1	8.2.1 Sistemi di saggio.....	90
8.2.2	8.2.2 Disegno sperimentale.....	90
8.2.3	8.2.3 -Preparazione degli estratti acquosi (WAFs) dal materiale di riferimento ISPRA RM050.....	91
8.2.4	8.2.4– Saggio di inibizione di crescita di alghe verdi monocellulari.....	92
8.2.5	8.2.5 – Saggio acuto con il crostaceo <i>Daphnia magna</i>	95
8.3	8.3 Elaborazione statistica dei risultati.....	96
8.4	8.4 Risultati.....	96
8.5	8.5 Conclusioni.....	105
8.6	8.6 Riferimenti.....	
9.	9. ISPRA IC033 “SAGGI DI TOSSICITÀ CON <i>VIBRIO FISCHERI</i> E <i>PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA</i> SU TOSSICO CIECO”.....	109
9.1	9.1 Materiali.....	109
9.2	9.2 Disegno Sperimentale.....	109
9.2.1	9.2.1 Valori assegnati.....	110
9.3	9.3 Elaborazione statistica e criteri di valutazione dell’acceptabilità dei risultati.....	111
9.4	9.4 Risultati.....	111
9.5	9.5 Conclusioni.....	115
9.6	9.6 Riferimenti.....	115
10.	10. ISPRA IC038 “SAGGI DI TOSSICITÀ ACUTA CON <i>DAPHNIA MAGNA</i> SU TOSSICO CIECO”.....	119
10.1	10.1 Materiali.....	119
10.2	10.2 Disegno Sperimentale.....	119
10.2.1	10.2.1 Valori assegnati.....	120
10.3	10.3 Elaborazione statistica e criteri di valutazione dell’acceptabilità dei risultati.....	121
10.4	10.4 Risultati.....	121
10.4.1	10.4.1 Partecipazione.....	121

10.4.2 <i>Analisi dei risultati</i>	121
10.5 Conclusioni.....	127
Tabelle z-score.....	134
10.6. Riferimenti.....	136
11. CONCLUSIONI.....	137

PREMESSA

I confronti interlaboratorio (*InterLaboratory Comparison o Proficiency test*), come indicato dalla norma UNI EN ISO/IEC17043:2010 che specifica i requisiti generali per la competenza degli organizzatori di prove valutative interlaboratorio, consistono *nell'organizzazione, esecuzione e valutazione di misurazioni o prove sugli stessi materiali o su materiali simili, da parte di due o più laboratori in conformità a condizioni prestabilite*^{1,2}. I confronti interlaboratorio sono quindi tra gli strumenti, richiamati anche al punto 5.9 della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 relativa ai requisiti per la della competenza dei laboratori, a cui i laboratori stessi possono ricorrere per il controllo della qualità dei risultati di prova o taratura. La partecipazione a tali esercizi, ove possibile, relativamente a tutte le prove oggetto di accreditamento *in termini di materiale/matrice /prodotto e in termini di misurando/proprietà misurata e metodo di prova*², è richiesta dall'Ente Nazionale di Accredimento (ACCREDIA) sia all'atto della domanda di accreditamento che in caso di aggiornamenti e variazioni del campo di accreditamento.

La necessità da parte dei laboratori delle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPA) di un appropriato sistema di garanzia e controllo della qualità richiede di dimostrare che i dati prodotti siano sotto un controllo statistico e che i metodi utilizzati risultino validati, oltre ad avere un sistema di gestione dei laboratori che risponda ai requisiti delle norme per la qualità. I confronti interlaboratorio sono strumenti a cui si ricorre per il controllo della qualità dei risultati di prova o taratura e infatti l'Area di Metrologia di ISPRA (ex Servizio di Metrologia Ambientale), da oltre un decennio organizza e progetta confronti interlaboratorio (CI) per i laboratori del Sistema Nazionale della Protezione dell'Ambiente e dal 2015 ha un Centro accreditato (Centro PTP n.10), ai sensi della norma UNI EN ISO/IEC17043:2010, per l'organizzazione di prove valutative sui metalli in suoli e sedimenti e su anioni e cationi in soluzione acquosa. Ha inoltre costituito con il Sistema Nazionale per la Protezione Ambientale una rete permanente di referenti delle Agenzie regionali, che, insieme alla possibilità di fruire di tali confronti, rappresenta uno strumento fondamentale per lo scambio di informazioni e conoscenze, a garanzia della comparabilità dei dati analitici di monitoraggio e controllo ambientale a livello nazionale.

In questa pubblicazione sono presentati, i confronti interlaboratorio in ambito ecotossicologico al fine di presentare l'esperienza maturata da ISPRA dal 2006 ad oggi nell'organizzazione di tali esercizi. Questa esperienza ha consentito di portare in accreditamento nel Centro PTP n.10 di ISPRA, anche gli schemi ecotossicologici in aggiunta a quelli già accreditati.

¹ Con riferimento alle tarature la definizione di confronto interlaboratorio è "Organizzazione, realizzazione e valutazione di tarature sullo stesso oggetto di taratura o su oggetti simili, da parte di due o più laboratori seguendo condizioni predeterminate" (Accredia RG-13).

² ACCREDIA RT-24

ACRONIMI

CI: Confronto interlaboratorio.

CRM: Materiale di riferimento certificato.

gdl: gradi di libertà.

RM: Materiale di riferimento.

RT: Regolamenti tecnici.

SC: Studio collaborativo.

AMB-LAB: ex Servizio di Metrologia Ambientale ora Area di metrologia.

LAT/RMP: laboratorio accreditato di taratura/Produttori materiali di riferimento.

che un determinato Organismo di Valutazione della Conformità soddisfa i criteri stabiliti da norme armonizzate e, ove appropriato, ogni altro requisito supplementare, compresi quelli definiti nei rilevanti programmi settoriali, per svolgere una specifica attività di valutazione della conformità (Reg. CE N. 765/2008 Capo 1, Art. 2, Comma 10).

CAS: numero di registro attribuito dal Chemical Abstract Service (CAS), divisione della American Chemical Society (Columbus, Ohio, USA) che assegna questo numero identificativo univoco ad ogni sostanza chimica descritta in letteratura.

CE o EC: numero CE presente in ESIS che comprende N° EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances - GU C 146 A del 15.6.1990), il numero ELINCS (European List of Notified Chemical Substances) per le sostanze nuove ed il numero NLP (No-Longer Polymers).

EC₅₀: *Effective Concentration 50. Effective Concentration 50:* Concentrazione di Effetto mediana. Rappresenta la concentrazione che produce nel 50% degli individui un effetto diverso dalla morte (ad es. immobilizzazione, ritardo di crescita, ecc.) in saggi sia acuti che cronici. E' da riferirsi al tempo di esposizione. Si può considerare anche l'effetto su percentuali di mortalità diverse, es. del 100% (EC₁₀₀).

ESIS: European chemical Substances Information System. Sistema di informazione europeo sulle sostanze chimiche

IUPAC: acronimo di International Union of Pure and Applied Chemistry (in italiano *Unione Internazionale di Chimica Pura ed Applicata*), che opera in accordo ed armonizza la propria nomenclatura e terminologia, ove necessario, con la IUPAP e l'ISO ed adotta il Sistema internazionale di unità di misura.

LC₀: *Lethal Concentration 0*, Concentrazione Letale 0. Concentrazione che non determina alcuna mortalità della popolazione. Generalmente estrapolata dalle curve di tossicità in saggi acuti.

LC₅₀: *Lethal Concentration 50*. Concentrazione Letale mediana. Rappresenta la concentrazione che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per esposizione ambientale (es. tossicità acquatica o inalatoria). Si deve riferire al tempo di esposizione (es. LC₅₀ 48 ore).

LD₀: *Lethal Dose 0*. Dose che non determina alcuna mortalità della popolazione. Generalmente estrapolata dalle curve di tossicità in saggi acuti.

LD₅₀: *Lethal Dose 50*. Dose Letale mediana. Dose della sostanza che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per *somministrazione diretta*. Si esprime generalmente per unità di peso corporeo dell'individuo (es. mg/kg di peso corporeo). Si può considerare anche l'effetto su percentuali di mortalità diverse, (es. 90% LD90).

LL₅₀: *Lethal Loading 50*. Carico Letale mediano. Concettualmente analogo alla LC₅₀ ma riferito ad una quantità scaricata nel sistema ambientale esposto.

LOAEL: Lowest-Observed Adverse-Effect Level. Rappresenta il livello (generalmente dose) più basso al quale è possibile evidenziare un effetto negativo.

LOEC: *Lowest-Observed Effect Concentration*. Rappresenta la concentrazione più bassa alla quale è possibile evidenziare un effetto.

LOEL: *Lowest-Observed-Effect Level*. Rappresenta il livello più basso al quale è stato possibile evidenziare un effetto.

LT₅₀: *Lethal Time 50*. Tempo Letale mediano. Rappresenta il tempo necessario a determinare la morte del 50% degli individui esposti a una concentrazione determinata di una sostanza.

NOAEC: *No-Adverse Effect Concentrations*. Concentrazione che non produce effetti avversi.

NOEC: *No-Observed Effect Concentration*. Concentrazione di nessun effetto osservato.

NOEL: *No-Observed Effect Level*. Rappresenta il livello più alto (concentrazione o dose) al quale non si è manifestato alcun effetto. Di norma si riferisce a saggi di tossicità cronica a lungo termine, ma può essere riferito anche a saggi di tossicità acuta.

SNPA: Sistema Nazionale della Protezione dell'Ambiente

SQA: standard di qualità ambientale

TERMINI E DEFINIZIONI

Accuratezza: Grado di concordanza fra un valore misurato e il valore vero di un misurando. (VIM “Vocabolario Internazionale di Metrologia (VIM) “UNI CEI 70099:2008).

Coefficiente di Variazione (CV) rapporto percentuale scarto tipo (deviazione standard) di una serie di misurazioni eseguite su aliquote diverse di uno stesso campione sul valore medio di tali misurazioni.

Endpoint tossicologico: il *tipo di effetto* (“tipo di danno, ovvero la funzione biologica compromessa) che viene misurato in un saggio ecotossicologico (mortalità, immobilizzazione, effetti sulla riproduzione, effetti sulla crescita degli individui, effetti sulla crescita di una popolazione, alterazione di parametri metabolici (metabolici) o fisiologici, alterazioni di caratteristiche comportamentali).

Loading rate concentration: tasso di carico, la quantità del prodotto che si deve mettere in equilibrio con il mezzo acquoso del saggio al fine di produrre un determinato “livello di effetto”.

Metodo di prova: Procedura tecnica specificata per eseguire una prova.

Metodo di prova sviluppato dal laboratorio (interno): metodo di prova messo a punto o adottato da un laboratorio sulla base di conoscenze desunte dalla letteratura scientifica e/o dall’esperienza pratica. Il metodo interno può essere sia un metodo sviluppato dal laboratorio che un metodo normalizzato o non normalizzato che è stato sostanzialmente modificato a seguito di particolari esigenze del laboratorio.

Norma: Documento prodotto mediante consenso e approvato da un organismo riconosciuto che fornisce, per usi comuni e ripetuti, regole, linee guida o caratteristiche relative a determinate attività o ai loro risultati, al fine di ottenere il miglior ordine in un determinato contesto.

Organismo test: organismo sul quale viene effettuato il saggio ecotossicologico.

Precisione: Grado di concordanza tra risultati di prova indipendenti ottenuti nelle condizioni stabilite. (ISO 5725-1:2004 “Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions”)

Procedura di prova: documento nel quale vengono dettagliate le modalità esecutive adottate dal laboratorio non compiutamente descritte dal metodo di prova citato nell’elenco delle prove accreditate. Nota: tale procedura non deve costituire modifica del metodo di prova citato nell’elenco delle prove accreditate.

Prova: Determinazione di una o più caratteristiche di un oggetto di valutazione della conformità, secondo una procedura.

Ripetibilità: precisione in condizioni di ripetibilità. (ISO 5725-1:2004 “Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions)

Riproducibilità: precisione in condizioni di riproducibilità. (ISO 5725-1:2004 “Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions)

Risposta: è la quantificazione dell’effetto che si vuole misurare e si può esprimere come % di incidenza in una certa popolazione dell’effetto stesso.

Robustezza: la robustezza di una procedura analitica è una misura della sua capacità di non essere influenzata da piccole, ma deliberate variazioni nei parametri del metodo e fornisce una indicazione della sua attendibilità durante il suo normale utilizzo. (ISO 5725-1:2004 “Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions)

Saggio di tossicità prova sperimentale che definisce in termini quantitativi la relazione tra esposizione ed effetto. Tradizionalmente gli studi per la stima di tossicità prendono in considerazione l’effetto mortalità. In tal senso, un saggio di tossicità consiste nel sottoporre alcuni organismi, a dosi crescenti di campione tossico, per un determinato periodo di tempo, al termine del quale sono contati, per ogni dose, il numero di organismi morti.

Saggio di ecotossicità o saggio ecotossicologico: saggio di tossicità che utilizza modelli biologici (batteri, alghe, crostacei, pesci, vermi, ecc..) per misurare l’attività di sostanze potenzialmente tossiche per l’ambiente.

Saggio di tossicità acuta o a breve termine: prova sperimentale che valuta gli effetti derivanti dall’esposizione di una popolazione ad un campione tossico, somministrato in una volta, per un breve periodo di tempo (24-96 ore). E’ detto anche saggio di tossicità a breve termine perché copre un arco temporale ridotto rispetto al ciclo di vita dell’organismo saggiato

Saggio di tossicità prolungata (o a lungo termine): prova sperimentale che valuta gli effetti derivanti dall’esposizione di una popolazione ad un campione tossico, somministrato in una volta, per periodi di tempo che coprono l’intero ciclo vitale, o una parte significativa di esso, o più cicli, dell’organismo saggiato.

Saggio di tossicità cronica: valutazione degli effetti derivanti dall’esposizione di una popolazione all’azione di un campione tossico, somministrato a basse dosi, nel tempo. L’effetto valutato è generalmente subletale, sulla riproduzione, velocità di crescita, modificazioni del comportamento, ecc.

Scarto tipo (deviazione standard): (di una variabile casuale o di una distribuzione di probabilità) radice quadrata della varianza. (UNI CEI ENV 13005:2000 “Guida all’espressione dell’incertezza di misura)

Validazione di un metodo conferma attraverso esame e con apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l’utilizzazione prevista sono soddisfatti. (UNI EN ISO 17025:2005).

1. INTRODUZIONE

In questa pubblicazione sono presentati i confronti interlaboratorio in ambito ecotossicologico, organizzati dall'ISPRA negli anni 2003-2016. L'organizzazione e gestione ha sempre seguito le norme in vigore; fino al 2009 la ISO/IEC GUIDE 43: 1997 e successivamente la UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010.

Come organizzatori si è sempre proceduto, per la individuazione dello scopo della prova valutativa o dello studio collaborativo, a una scelta collegiale con i laboratori delle Agenzie, così da definire la coppia materiale/prova più idonea a rappresentare le problematiche emergenti dalla attività di routine degli stessi laboratori.

Questo nel tempo ha portato ad affrontare diverse tematiche nel campo del monitoraggio ambientale tra cui quello, qui trattato, dell'ecotossicologia. Generalmente i RM/CRM utilizzati sono stati prodotti o preparati dal Centro per la produzione di materiali di riferimento accreditato (Centro LAT/RMP 211) attivo all'interno di ISPRA.

Lo schema tipo adottato per i circuiti è stato quello a partecipazione sequenziale, ovvero con la distribuzione ai laboratori partecipanti di sottocampioni (campioni di prova) selezionati da un Materiale di Riferimento (RM) o da un Materiale di Riferimento Certificato (CRM). In questo schema tutti i partecipanti al confronto effettuano simultaneamente le misurazioni sul materiale di cui non conoscono i valori assegnati, adottando liberamente i metodi in uso presso il loro laboratorio. I risultati delle misurazioni, secondo tempi prestabiliti, sono poi restituiti e sottoposti alla elaborazione statistica in accordo alle norme internazionali vigenti. A ciascun partecipante è restituito un punteggio (ad esempio z-score e/o E_n -score), che esprime la valutazione della prestazione del laboratorio, rispetto alla quale valutare le eventuali azioni correttive o di miglioramento da implementare. Lo stesso schema può essere utilizzato per determinare le caratteristiche di prestazione di una specifica procedura di misurazione, ad esempio in risposta a vincoli normativi e/o all'affermarsi di nuove tecniche strumentali di misura, in questo caso si parla di studi collaborativi.

Per la stesura del presente documento si è fatto riferimento ai rapporti conclusivi redatti a valle delle attività di analisi e valutazione statistica dei risultati di ciascun confronto. Per quelli organizzati prima dell'anno 2008 (anno della fusione di APAT, INFS e ICRAM³ in ISPRA) è stata lasciata la denominazione APAT originaria.

In generale gestire un CI significa organizzare un flusso di informazioni verso i partecipanti e uno di ritorno verso l'organizzatore; nell'ordine tali flussi possono essere articolati come fase di pianificazione (definizione dello scopo, schema e potenziali partecipanti, individuazione del campione da sottoporre a prova), fase di stesura dei protocolli tecnici e delle istruzioni necessarie allo svolgimento dell'esercizio, fase di definizione delle procedure per la gestione della comunicazione (partecipazione, invio risultati e loro restituzione).

Di questi passaggi un aspetto rilevante è l'individuazione del campione da sottoporre a prova, ovvero la selezione di un materiale di riferimento (RM) o di un materiale di riferimento certificato (CRM) di caratteristiche adeguate allo scopo del circuito stesso. Nei circuiti qui rappresentati sono sempre stati forniti materiali caratterizzati e gestiti in conformità a ISO Guide 34:2009 e UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, siano stati questi certificati o meno. Il tipo di schema adottato è quello a partecipazione simultanea: invio contemporaneo di un campione incognito ai partecipanti con la richiesta di restituire il risultato di una determinata prova da effettuare entro una certa data. In tabella 1.1 si riporta l'elenco dei confronti interlaboratorio e degli studi collaborativi (2003-2016) organizzati da ISPRA.

I confronti interlaboratorio sono utilizzati per diversi scopi. Questi comprendono (l'elenco non è esaustivo):

1. Monitoraggio e valutazione continua delle prestazioni di un laboratorio in relazione a prove eseguite in condizioni prestabilite.

2. Assicurazione della qualità e della confrontabilità dei risultati delle misurazioni contenute nei certificati di taratura emessi in accreditamento (laboratori/centri di taratura).

3. Rilevazione di problemi all'interno dei laboratori e attuazione di misure per il loro miglioramento.

4. Formazione dei laboratori partecipanti in base ai risultati di tali confronti.

5. Assicurazione supplementare di fiducia nei confronti del cliente dei laboratori.

6. Identificazione di differenze tra laboratori.

7. Validazione del metodo all'interno del proprio laboratorio.

.....

Fonte ACCREDIA RT-24

³ APAT: Agenzia per la Protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici; INFS: Istituto Nazionale Fauna Selvatica; ICRAM: Istituto Centrale per la Ricerca Scientifica e Tecnologica applicata al mare.

I confronti interlaboratorio sono distinti in prove valutative e studi collaborativi. La prova valutativa consente al laboratorio partecipante di impiegare il metodo di routine utilizzato per quella specifica prova, e quindi in generale mira ad una analisi della prestazione (“performance”) del laboratorio. Gli studi collaborativi sono invece destinati alla valutazione delle caratteristiche di prestazione di un particolare metodo in un determinato campo di applicazione; in questo caso è richiesto ai laboratori partecipanti di eseguire pedissequamente il metodo e le istruzioni riportate in un protocollo condiviso. Questa tipologia di studi è rivolta alla definizione di alcune grandezze prestazionali del metodo sotto studio, e alla determinazione della stima dell’incertezza del metodo stesso.

Il documento presenta, nell’ordine: una breve descrizione delle prove valutative, ovvero confronti interlaboratorio e studi collaborativi, una presentazione del processo di organizzazione degli stessi e infine una presentazione di dettaglio per ciascuna prova, estratta dai rapporti conclusivi originali.

I Rapporti Conclusivi dei confronti e degli studi riportati possono essere richiesti nella loro versione originale all’indirizzo e-mail: *metrologia.ambientale@isprambiente.it*

2. SCHEMA DI ORGANIZZAZIONE DELLE PROVE VALUTATIVE INTERLABORATORIO

L’organizzazione delle prove valutative ha seguito il seguente schema:

- a) *fase di avvio*: individuazione e definizione, in collaborazione con laboratori delle Agenzie, dello scopo del circuito;
- b) *pianificazione delle attività e l’individuazione dei partecipanti*: individuazione della coppia materiale/saggio e definizione del progetto, articolazione del CI e aspetti tecnici, logistici, organizzativi e temporali di massima;
- c) *stesura del Protocollo*: informazioni di dettaglio da fornire a i partecipanti per lo svolgimento dell’esercizio così come pianificato;
- d) *comunicazione di avvio e raccolta delle adesioni*: definizione della lista dei partecipanti;
- e) *distribuzione del Materiale di Riferimento*: gestione e spedizione dei campioni di prova nei tempi e nei modi previsti dal Protocollo e nel rispetto dei requisiti di sicurezza.
- f) *svolgimento dell’esercizio*: tempo assegnato ai laboratori per lo svolgimento dell’esercizio e l’invio dei risultati della prova;
- g) *elaborazione dei risultati e prima diffusione*: raccolta, analisi statistica e valutazione dei risultati ricevuti e stesura e comunicazione del rapporto preliminare con l’invito a restituire commenti e osservazioni;
- h) *stesura del rapporto conclusivo e chiusura delle attività*: informazioni di dettaglio relativamente al trattamento statistico dei risultati, la discussione di questi e le conclusioni.

Principali tipologie di confronti interlaboratorio

1. *Prove valutative proposte da organizzatori indipendenti. In esse, il laboratorio che vi partecipa ha la responsabilità di verificare la competenza dell’organizzatore, che deve dare evidenza di essere accreditato in accordo alla norma UNI EN ISO/IEC17043 o comunque di operare in conformità ad essa.*
2. *Prove valutative organizzate dall’infrastruttura Europea dell’accreditamento EA (European cooperation for Accreditation), dall’APLAC (Asian Pacific Laboratory Accreditation Cooperation) o offerte nell’ambito della cooperazione internazionale. In questo caso ACCREDIA seleziona uno o più laboratori, in funzione delle prove oggetto di accreditamento.*
3. *Audit di misure. Possono essere effettuati dagli ispettori tecnici nel corso delle visite di valutazione, quando sono disponibili materiali di riferimento certificati al fine di verificare la competenza tecnica di un singolo laboratorio.*
4. *Prove valutative basate su confronti bilaterali. Sono accettate solo quando non siano disponibili altri tipi di confronti interlaboratorio. I risultati, a causa dell’esiguità dei dati e della loro non rappresentatività, sono ritenuti poco significativi.*

Fonte ACCREDIA RT-24

I contenuti dei documenti a corredo del circuito sono così articolati:

Protocollo: descrizione delle proprietà d’interesse (parametri chimici, fisici e/o biologici), intervallo entro il quale sono attesi i valori dei parametri oggetto del CI, corretto utilizzo del materiale di prova (conservazione/manipolazione del RM/CRM), procedure operative per l’esecuzione della prova e dell’eventuale campionamento, modalità di restituzione dei risultati delle misure e delle relative incertezze; il modello statistico utilizzato per l’elaborazione dei risultati; i criteri per la valutazione di accettabilità delle prestazioni dei partecipanti; le modalità di comunicazione con i laboratori;

Rapporto preliminare e/o conclusivo: anagrafica dell'organizzatore e del coordinatore, data di emissione e lo stato del rapporto (preliminare o conclusivo), dichiarazione del livello di riservatezza, informazioni analitiche del materiale di prova (RM/CRM), valori assegnati e le relative incertezze, modalità di calcolo, i criteri di valutazione e le prestazioni dei laboratori, i risultati restituiti, l'elaborazione statistica, i commenti e/o le raccomandazioni in relazione agli esiti del CI (solo per il rapporto conclusivo).

Tabella 1.1 – Elenco dei confronti interlaboratorio e degli studi collaborativi (2003-2016) organizzati dall'ex Servizio di Metrologia Ambientale dell'ISPRA (aggiornata al 2017)

Prova	Oggetto	Misurandi
APAT-IC001	Metalli in otto sediment lacustri	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn
APAT-IC002	Metalli in Compost	As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Zn
APAT-IC003	Strategie di campionamento di suoli in area agricola	Campionamento
APAT-IC004	Metalli in acqua sotterranea e suolo	Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn
APAT-IC005	Determinazione dei macrodescrittori in acque	pH, Conducibilità, COD, Cl, NO ₃ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , Na ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , NH ₄ ⁺
APAT-IC006	Test di tossicità acuta con <i>Daphnia magna</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇ e KCl EC50-24 h
APAT-IC007	Determinazione dei macrodescrittori in acque	pH, Conducibilità, COD, Cl, NO ₃ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , Na ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , NH ₄ ⁺
APAT-SC001	Studio Collaborativo – Pesticidi in matrice acquosa	Clorpirifos, Desetilatrazina, Metolaclor, Molinate
APAT-IC008	Caratterizzazione di suolo contaminato ai sensi del DM 471/99	As, Cr, Cu, Hg, IPA, 1,2,4-triclorobenzene, fenolo, anilina
APAT-IC009	Fitofarmaci in matrice acquosa	Clorpirifos, Desetilatrazina, Metolaclor
APAT-IC010	Metalli nel suolo: valutazione delle fasi del processo analitico	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn
APAT-IC011	IPA in un suolo contaminato. Valutazione delle fasi del processo analitico	19 Idrocarburi policiclici aromatici
P59-2008	Misura di PCB e PCDD/F in un suolo	PCB101, PCB118, PCB149, PCB153, PCB156, PCB170, PCB180, PCDD (2,3,7,8 -1,2,3,7,8 - 1,2,3,6,7,8 - 1,2,3,7,8,9)
APAT-IC012	Parametri chimici ed ecotossicologici su lisciviato ottenuto da rifiuto (APAT RM015)– suolo contaminato	As, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb EC ₅₀ -24 h (<i>D. magna</i>) RM015 e K ₂ Cr ₂ O ₇
APAT-IC013	Amianto con microscopia elettronica a scansione	Densità di fibre areodisperse
APAT-IC014	Misure selettive in frequenza di campi elettromagnetici	Campo elettrico
APAT-IC016	Misure chimiche in acqua ai sensi del D.Lgs 152/2006	pH, conducibilità, Cl, F, NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , Na ⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺
ISPRA-SC003	Suoli contaminate- Convalida del procedimento di misurazione per la determinazione degli idrocarburi C>12	Idrocarburi C>12
ISPRA-SC004	Acque – Convalida del procedimento di misurazione del COD con il metodo in cuvetta	COD
ISPRA-IC017	Frazione PM ₁₀ di material particolato in aria ambiente	PM ₁₀
ISPRA-IC018	Materiale particolato in aria ambiente	PM ₁₀
ISPRA-IC019	Sedimenti – Misura della frazione di massa di elementi in tracce	As, Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb
ISPRA IC020	Acque – Valutazione ecotossicologica mediante saggi di tossicità acuta con <i>Vibrio fischeri</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇ EC ₅₀ -15 e 30 min CdCl ₂ ·2,5H ₂ O EC ₅₀ - 5, 15 e 30 min

ISPRA IC021	Acque superficiali- Misura della concentrazione in massa di elementi in tracce a livelli prossimi agli SQA	As, Cd, Ni, Pb, Zn
ISPRA IC022	Aria ambiente – Materiale particolato	PM ₁₀ , PM _{2,5}
ISPRA IC023	Aria ambiente – Misura delle concentrazioni NO, NO ₂ e O ₃	NO, NO ₂ e O ₃
ISPRA SC005	Acque reflue – Convalida del procedimento di misurazione del COD con il metodo in cuvetta	COD
ISPRA IC024	Sedimenti lagunari – Misura della frazione in massa di IPA	Fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(a)pirene, Benzo(ghi)perilene
ISPRA IC025	Sedimenti lacustri- Misura della frazione di massa di elementi in tracce	As, Cd, Co, Cu, Hg, Ni
ISPRA IC026	Acque superficiali – Misure della concentrazione in massa di anioni e cationi	Cl ⁻ , F ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺
ISPRA IC027	Acque – Misura della concentrazione in massa di composti organici (sostanze prioritarie)	Atrazina, Clorpirifos, Simazina, DEHP, Benzo(a)pirene, Fluorantene
IC ISPRA-ISS	Acque superficiali – Identificazione tassonomica delle diatomee bentoniche – Metodo ICMi	Diatomee, EQB
ISPRA SC006	Studio collaborative – Metodologie di valutazione del rumore da impianti eolici	L _A , L _{Aeq}
ISPRA IC028	Aria ambiente – Materiale particolato	PM ₁₀ , PM _{2,5} , metalli
ISPRA IC031	Misura della concentrazione di massa di anioni e cationi nelle acque	-
ISPRA IC032	Misura della concentrazione in massa di sostanze prioritarie nelle acque	-
ISPRA IC033	Saggi di tossicità con <i>Vibrio fischeri</i> e <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> su tossico cieco	<i>V. fischeri</i> EC ₅₀ -30 minuti e <i>P. subcapitata</i> EC ₅₀ -72h (per tossico cieco e tossico di riferimento)
ISPRA SC007	Studio collaborativo ecotossicologico su lisciviato di rifiuto mediante saggi con <i>P. subcapitata</i> e <i>D. magna</i>	Inibizione della crescita algale (IR%) 72 h Percentuale di immobili di <i>Daphnia</i> 24 e 48 h
ISPRA SC008	Acque – Convalida del procedimento di misurazione degli idrocarburi totali	Idrocarburi totali
ISPRA IC038	Saggi di tossicità acuta con <i>Daphnia magna</i> su tossico cieco	<i>Daphnia magna</i> EC ₅₀ -24h e 48h (per tossico cieco e tossico di riferimento)

L'elenco degli interconfronti aggiornato è presente sul sito di ISPRA all'indirizzo www.isprambiente.gov.it/it, sotto la voce Laboratori - Metrologia Ambientale.

3. PANORAMICA DEGLI ESERCIZI PRESENTATI

Le prove valutative presentate hanno interessato saggi su diverse matrici ambientali, tutte individuate in collaborazione con laboratori delle Agenzie Ambientali regionali e provinciali. Oltre questi si presentano anche i risultati di studi collaborativi la cui programmazione è stata resa necessaria per la validazione di saggi specifici.

La scelta dei saggi ha tenuto conto della richiesta o di normative specifiche o di problematiche emergenti; in particolare il Decreto legislativo 152/2006 s.m.i. prevede „ai fini dell'accettabilità delle acque di scarico, l'effettuazione di saggi ecotossicologici.

Da qui l'impegno come organizzatori di sviluppare e organizzare circuiti interlaboratorio ad hoc per ricomprendere le diverse tipologie di prove con organismi viventi, che potessero essere utilizzati come strumenti per assicurare la qualità e la confrontabilità dei dati ottenuti dal monitoraggio. La panoramica di seguito presentata si riferisce alle prove valutative nell'ambito ecotossicologico. Nella rassegna sono presentati sei confronti interlaboratorio e uno studio collaborativo. Per ognuno, oltre alla breve descrizione a seguire, si fornisce una descrizione dei materiali e metodi utilizzati e la discussione dei risultati.

Molti dei circuiti hanno avuto come scopo la valutazione della tossicità acquatica, mediante l'impiego di saggi con di organismi di tipo diverso: crostacei (*Daphnia magna*, *Artemia salina*), batteri bioluminescenti (*Vibrio Fischeri*), alghe (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Dunaliella tertiolecta*

Test di tossicità acuta con *Daphnia magna* - 2003

Il primo circuito della rassegna *test di tossicità acuta a 24 ore con Daphnia magna, tossico di riferimento bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇)* è stato organizzato nel 2003 a valle della convalida del saggio secondo ISO UNI CEN 6341:1998 con organismi provenienti da forme criptobiotiche (uova durature o ephippi) per verificarne la variabilità intra ed interlaboratorio.⁴ Per l'esecuzione sono state accettate sia le prove eseguite con il DaphtoxKit F™ Magna (di seguito indicato come kit) che con esemplari provenienti da allevamenti propri, lasciando la possibilità di scegliere la tipologia di acqua pura (bidistillata, deionizzata, MilliQ) comunque saggiata per assicurare l'assenza di tossicità. Nel caso di organismi da allevamento sono state richieste anche informazioni sulla metodologia utilizzata per l'allevamento e sulle modalità di esecuzione del protocollo. L'end point utilizzato per la valutazione è stato l'EC₅₀ dopo 24 ore di esposizione ed è stato calcolato lo z-score per ogni laboratorio.

Il valore di riferimento è stato posto uguale al valore di pre-convalida ottenuto da cinque laboratori di riferimento a cui era stato chiesto di eseguire il metodo con lo stesso lotto di ephippi. Il protocollo ottenuto con le indicazioni sull'esecuzione del test è stato invece utilizzato come documentazione di riferimento distribuito poi a tutti i laboratori partecipanti al circuito.

APAT IC-06

Si tratta di un *test di tossicità acuta a 24 ore con Daphnia magna, con tossico di riferimento bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) e tossico cieco*, effettuato nel 2006. I laboratori hanno potuto utilizzare come organismi sia forme criptobiotiche (uova durature o ephippi) che di allevamento. Sono state utilizzate due diverse tipologie di esecuzione del saggio. Per gli ephippi l'utilizzo del protocollo APAT-IRSA-CNR-sviluppato in occasione del circuito del 2003, mentre per gli organismi da allevamento il metodo normalmente in uso presso il laboratorio. Scopo del circuito la valutazione dell'accettabilità e la determinazione della precisione dei metodi in termini di ripetibilità e riproducibilità. Il confronto tra i laboratori è avvenuto sulla base dei valori di EC₅₀ dopo 24 ore di esposizione (EC₅₀-24 h) ed è stato calcolato lo z-score per ogni laboratorio.

APAT IC012

La prova valutativa interlaboratorio *Parametri chimici ed ecotossicologici su lisciviato ottenuto da una matrice solida (rifiuto – suolo contaminato)*, programmazione 2007-2008, ha avuto come scopo l'analisi dei risultati derivanti da misure chimiche ed ecotossicologiche di lisciviato da un suolo contaminato da metalli. Per il test di cessione è stato utilizzato il metodo UNI EN 12457-2: 2004, per il test ecotossicologico è stata data indicazione di usare il metodo normalmente in uso nel laboratorio partecipante. Si è trattato di un esercizio con una doppia finalità: la valutazione di eventuali scostamenti nella misurazione dei parametri chimici dovuti all'effetto matrice, e la verifica delle modalità e della corretta applicazione del metodo di liscivazione.

⁴ documento finale "II Interconfronto Nazionale Test di tossicità acuta con *Daphnia magna*, 2003" A. Sbalchiero (APAT), R. Baudo, M. Beltrami (CNR-ISE) Servizio di Metrologia Ambientale - APAT, 2004. I risultati relativi al saggio di tossicità acuta eseguito con allevamenti di *Daphnia magna* non sono stati trattati.

Il materiale oggetto della prova è stato fornito dal Centro LAT (APAT RM015) ed è un terreno contaminato con concentrazioni di metalli medio alte. Sul materiale imbottigliato sono state condotte prove di omogeneità, mentre per la stabilità sono state eseguite prove in condizioni isocrone per il periodo di durata del circuito d'interconfronto.

In questa rassegna ci soffermeremo solo sui risultati ottenuti dalle prove ecotossicologiche. Si ricorda che il rapporto finale del confronto interlaboratorio, che include pertanto anche la discussione delle prove chimiche, è disponibile all'indirizzo già citato.

ISPRA-IC020

Il confronto interlaboratorio *Valutazione ecotossicologica di contaminazione delle acque mediante saggi di tossicità acuta con Vibrio fischeri* è stato organizzato negli anni 2011-2012 allo scopo di analizzare le misure relative alla determinazione dell'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal citato batterio per effetto di un tossico di riferimento (dicromato di potassio, $K_2Cr_2O_7$) e di un tossico cieco (cloruro di cadmio emipentaidrato, $CdCl_2 \cdot 2,5 H_2O$), e nel contempo valutare le modalità e la corretta applicazione del metodo di saggio.

Per l'esecuzione dei saggi, è stato reso obbligatorio l'utilizzo di ceppi batterici di *Vibrio fischeri* nella forma di sospensioni congelate provenienti da preparati commerciali acquistati *ad hoc* e provenienti dal medesimo lotto di produzione. I laboratori sono stati, tuttavia, lasciati liberi di adottare il proprio sistema di analisi per la misura dell'inibizione della bioluminescenza (Microtox o Lumistock).

Il confronto tra laboratori è avvenuto sulla base dei valori di EC_{50} dopo 15 e 30 minuti di esposizione con il tossico di riferimento e di EC_{50} dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione con il tossico cieco.

Sono state altresì valutate, per ogni laboratorio, il rispetto delle condizioni di validità del saggio con *Vibrio fischeri*, nonché le modalità di preparazione e/o utilizzo delle soluzioni osmotica, di riattivazione e di diluizione prodotta dalla ditta che distribuisce anche i ceppi batterici.

Studio collaborativo - ISPRA SC007

Lo "Studio collaborativo ecotossicologico su lisciviato di rifiuto mediante saggi con *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Daphnia magna*", denominato ISPRA SC007 effettuato nel 2014-2015, è stato avviato al fine di rispondere alle richieste normative avanzate dai Regolamenti ADR e CLP in merito alla caratteristica di pericolo "ecotossico" (HP14).

La procedura di misurazione da validare è stata messa a punto con preparazione di estratti acquosi di rifiuto (WAFs) con *loading rate* pari a 100 mg/L da un rifiuto solido (materiale di prova distribuito da ISPRA come materiale di riferimento) per l'esecuzione di test ecotossicologici con due sistemi di saggio: l'alga d'acqua dolce della specie *Pseudochirckneriella subcapitata* e il crostaceo d'acqua dolce della specie *Daphnia magna*.

L'insieme dei risultati forniti dai laboratori hanno costituito la base su cui calcolare, ai sensi della ISO 5725-2, lo scarto tipo di ripetibilità e di riproducibilità per i sistemi di saggio applicati al materiale di prova.

A valle di questo studio è stata, quindi, messa a punto una procedura per la preparazione dei campioni di rifiuto da sottoporre a saggi ecotossicologici.

ISPRA-IC033

Il confronto interlaboratorio "*Saggi di tossicità con Vibrio fischeri e Pseudokirchneriella subcapitata su tossico cieco*" è stato organizzato allo scopo di valutare la prestazione dei laboratori nella determinazione dell'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal batterio *Vibrio fischeri* e dell'inibizione di crescita dell'alga verde monocellulare *Pseudokirchneriella subcapitata*.

I parametri richiesti, relativi alla prova definitiva del saggio di tossicità con *Vibrio fischeri*, sono stati i seguenti:

- valore di EC_{50} - 30 minuti con il TR, dicromato di potassio
- valore di EC_{50} - 30 minuti con il TC, ISPRA RM065

I parametri richiesti, relativi alla prova definitiva del saggio di tossicità con *Pseudokirchneriella subcapitata*, sono i seguenti:

- valore di $ECr_{50-72 \pm 2}$ h con il TR, dicromato di potassio
- valore di $ECr_{50-72 \pm 2}$ h con il TC, ISPRA RM065.

Tutti i valori di EC_{50} , inviati dai laboratori, sono stati sottoposti al test per la verifica della normalità di Shapiro-Wilk, sono stati quindi trasformati in logaritmo base 10 secondo quanto riportato nel documento "Environment Canada, 2005").

I valori di consenso sono stati ottenuti quale media robusta, anti-trasformata, dei valori logaritmici di EC_{50} (SOFTWARE AMC, ISO 13528:2005).

Nei prossimi capitoli sono riportati i rapporti finali delle prove valutative e degli studi collaborativi fornendo la descrizione di materiali e metodi utilizzati dai laboratori con le relative elaborazioni statistiche e la discussione dei risultati con le conclusioni derivanti dai singoli esercizi.

ISPRA-IC038

Il confronto interlaboratorio ISPRA IC038 “Saggi di tossicità con *Daphnia magna* su tossico cieco” finalizzato a porre a confronto i risultati di misure ecotossicologiche eseguite su materiali di prova dai laboratori del Sistema Nazionale a rete per la protezione dell'ambiente (SNPA) .

Il disegno sperimentale della prova ha previsto la determinazione dell'inibizione della mobilità della *Daphnia magna* per effetto di un tossico di riferimento (dicromato di potassio), necessario per avere indicazioni sulla sensibilità degli organismi, e la determinazione dell'inibizione della mobilità e della percentuale di immobilizzazione della *Daphnia magna* per effetto di un tossico cieco (solfato di zinco eptaidrato). La prova ha consentito inoltre di acquisire informazioni circa il grado di dispersione dei risultati forniti dai laboratori impegnati nei saggi suddetti.

I parametri oggetto della prova valutativa relativo al saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna* sono i seguenti:

- per il tossico di riferimento: valore di $EC_{50-24\text{ h}}$, espresso in mg L^{-1} di sale $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, determinato secondo il metodo di calcolo in uso presso il laboratorio partecipante.
- per il tossico cieco ISPRA RM074:
 - ✓ valore di $EC_{50-24\text{ h}}$ e $EC_{50-48\text{ h}}$, espresso in mg L^{-1} , determinato secondo il metodo di calcolo in uso presso il laboratorio partecipante;
 - ✓ percentuale di immobilizzazione.

Tutti i valori di EC_{50} , inviati dai laboratori, sono stati sottoposti al test per la verifica della normalità di Shapiro-Wilk, sono stati quindi trasformati in logaritmo base 10 secondo quanto riportato nel documento “Environment Canada, 2005” [3].

Il valore assegnato di riferimento per ISPRA RM074 ($EC_{50-24\text{ h}}$ e $EC_{50-48\text{ h}}$) corrisponde al valore di consenso dei risultati delle misure dei laboratori partecipanti ed è ottenuto quale media robusta, anti-trasformata, dei valori logaritmici di EC_{50} .

4. TEST DI TOSSICITÀ ACUTA CON DAPHNIA MAGNA – ANNO 2003

Scopo	Convalida del saggio di tossicità acuta con <i>Daphnia magna</i> , secondo ISO UNI CEN 6341:1998 con organismi provenienti da forme criptobiotiche (uova durature o ehippi) di <i>Daphnia</i> Daphtoxkit F TM (kit).
Saggio Tossico di riferimento Sistema di saggio	Tossicità acuta 24 ore (h) con tossico di riferimento dicromato di potassio (K ₂ Cr ₂ O ₇). Neonati di <i>Daphnia magna</i> Straus nati da meno di 24 ore: 20 neonati/concentrazione (compreso il controllo) distribuiti in quattro repliche (5 neonati/replica).
Numero di Partecipanti	55 ARPA/APPA e laboratori afferenti a istituzioni pubbliche e private*.
Valore medio di riferimento*	EC ₅₀ -24 ore =1,146 (0,600-1,692) mg/L
Dettagli del saggio	Ehippi di <i>Daphnia</i> sono posti a schiudere per 72-90 ore a 21 °C (± 1°C) con un'illuminazione continua compresa tra 6000 e 8000 lux. I neonati nati da meno di 24 ore sono quindi esposti ad almeno cinque concentrazioni di K ₂ Cr ₂ O ₇ per un periodo di 24 ore. La risposta del sistema di saggio è valutata come concentrazione iniziale (cioè presente all'inizio del test) che in 24 ore immobilizza il 50% degli organismi esposti → come EC ₅₀ -24 ore (ISO 6341).

* La lista completa dei laboratori che hanno restituito i risultati è mostrata nella tabella 4.1. Su 55 adesioni ricevute, 49 laboratori hanno trasmesso i risultati finali richiesti entro la data di scadenza prestabilita. A ciascuno dei laboratori è stato assegnato un codice identificativo cui sono associati anche i risultati restituiti ed elaborati.

4.1 Materiali

Il materiale di prova è costituito dal sale, tossico di riferimento, dicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) fornito a ciascun laboratorio nella quantità di 100 mg. Le aliquote del sale sono state preparate presso i laboratori APAT di Castel Romano.

Materiale fornito, a ciascun laboratorio partecipante:

- Protocollo metodologico per l'esecuzione di tutte le fasi del saggio e la modalità di registrazione dei risultati.
- N° 3 fiale con ehippi (n° lotto DM 150103) – Provette in plastica da 1 ml ricoperte con alluminio, contenenti ehippi di *Daphnia magna*, da conservare in frigorifero (4 ±1 °C) fino al momento dell'uso.
- N° 1 set di soluzioni concentrate dei seguenti sali: Cloruro di calcio diidrato (CaCl₂·2H₂O), Solfato di magnesio eptaidrato (MgSO₄·7H₂O), Idrogenocarbonato di sodio (NaHCO₃), Cloruro di potassio (KCl) per la preparazione di acqua ISO Standard (2 L) sufficiente all'esecuzione di tre test completi.
- N° 1 fiala contenente 100 mg del tossico dicromato di potassio, K₂Cr₂O₇.
- N° 3 Piastre di Petri in plastica (10 cm diametro).
- N° 3 Piastre multi pozzetto in policarbonato costituite da 6 pozzetti per il risciacquo e 24 pozzetti per le soluzioni di tossico.
- N° 3 Striscie di parafilm per sigillare le piastre multipozzetto e minimizzare i rischi di evaporazione durante l'incubazione degli organismi.
- N° 3 Micropipette in polietilene per il trasferimento dei neonati di *Daphnia magna*
- N° 1 Microsetaccio per il risciacquo degli ehippi.
- N° 3 Fogli Excell per la registrazione dei risultati (es. figura 4.1).
- N° 2 Moduli semilogaritmici per interpolazione grafica per la determinazione rapida e manuale dell'EC₅₀.
- N° 1 foglio "specifiche" indicante il numero di lotto degli ehippi forniti, il numero di lotto delle soluzioni concentrate di sali e i valori di EC₅₀-24 h per il K₂Cr₂O₇ ottenuto dai 5 laboratori di riferimento che hanno eseguito la pre-convalida del protocollo del saggio.

Tabella 4.1 – Laboratori ARPA/APPA e laboratori di altre Istituzioni che hanno restituito i risultati della prova valutativa “II Interconfronto Nazionale Daphnia magna”

Ente	Città
ARTA Abruzzo	Teramo
ARTA Abruzzo	Campobasso
ARTA Abruzzo	Pescara
ARPA Emilia Romagna	Ravenna
ARPA Emilia Romagna	Reggio Emilia
ARPA Emilia Romagna	Ferrara
ARPA Friuli Venezia Giulia	Gorizia
ARPA Friuli Venezia Giulia	Gorizia
ARPA Lombardia	Milano e Melegnano
ARPA Lombardia	Bergamo
ARPA Marche	Macerata
ARPA Molise	Isernia
AUSL 7 Sicilia	Ragusa
ARPA Toscana	Piombino
ARPA Toscana	Arezzo
ARPA Toscana	Livorno
ARPA Toscana	Pistoia
ARPA Toscana	Prato
ARPA Toscana	Lucca
ARPA Toscana	Grosseto
ARPA Umbria	Perugia
ARPA Val D'Aosta	Aosta
ARPA Veneto	Belluno
ARPA Veneto	Vicenza
ARPA Veneto	Rovigo
ARPA Veneto	Verona
ARPA Veneto	Treviso
ARPA Veneto	Venezia
CNR-ISE	Verbania
Shoreline	Trieste
Acq. pugliese	Bari
Cesi SpA	Piacenza
Metapontum Agrobios	Matera
Università Insubria	Como
ISRIM	Terni
Laboratorio Ambientale Ente Autonomo Flumendosa	Buscate (MI)
Consorzio Dep. Alto Toce	Cagliari
Fenice SpA	Gravellona Toce (VB)
LIESP	Rivoli (TO)
Ist. Zooprofilattico	Trento
II Università Napoli	Teramo
APAT Metrologia Ambientale	Caserta
Lab Biologico Provinciale Laives	Roma
ENI Div. E&P	Bolzano
SIAD SpA	San Donato Milanese (MI)
Centro Analisi Chimiche Petillo	Osio Sopra (BG)
EcoBioqual	Nola
ENEA Casaccia	Torino
	Roma

Nota: per ogni laboratorio è indicato un solo referente.

4.2 Disegno sperimentale

I laboratori hanno dovuto eseguire le seguenti prove, nell'ordine:

1. test di controllo di qualità dell'acqua pura utilizzata per la preparazione dell'acqua ISO Standard;
2. test di tossicità acuta (24 h) con $K_2Cr_2O_7$ e calcolo dell' EC_{50} ;
3. come la prova 2 da eseguirsi solo se la prova 2 non rispetta i criteri di validità.

Scopo della prima prova è stata la valutazione della qualità dell'acqua pura (bidistillata, deionizzata, MilliQ) utilizzata dai laboratori per la preparazione dell'acqua di diluizione degli organismi e del tossico (acqua ISO Standard), mediante verifica del numero di neonati ottenuti al termine del periodo di schiusa e successiva

incubazione per 24 ore in presenza di sola acqua ISO Standard. Qualità accettata con una schiusa di almeno di 120 neonati e una mortalità <10% al termine delle 24 ore.

In caso di mortalità superiore al 10%, ripetizione del controllo utilizzando acqua pura di origine differente con un nuovo set di Sali (reinvio dagli organizzatori).

Seconda prova esecuzione di un saggio di tossicità acuta (24 h) e calcolo del valore di EC₅₀-24 h per valori di diluizioni di dicromato di potassio, K₂Cr₂O₇: 0,32 – 0,56 – 1,0 – 1,80 – 3,2 mg/L.

In caso di mancato raggiungimento dei criteri di validità come indicati al paragrafo 2.4.4, la prova era da considerarsi non valida e andava ripetuta (prova n° 3), utilizzando soluzioni di tossico preparate *ex novo*.

4.2.1 Criteri di validità

Il saggio di tossicità acuta (24 h) con dicromato di potassio è stato considerato valido

se:

- la percentuale di organismi immobili è risultata ≤ 10%;
- il valore di EC₅₀-24 h stimato (graficamente o con opportuno sistema di calcolo) risulta compreso nell'intervallo di riferimento (0,600-1,692 mg/L) identificato nel test di pre-convalida.

4.2.2 Registrazione dei risultati

Di seguito si riportano le informazioni richieste e da registrare nell'apposito modulo, vedi figura 4.1, fornito con il protocollo:

- Nome del laboratorio e dell'operatore.
- Data di esecuzione del test.
- Numero di organismi ottenuti nella schiusa (raccolti entro 90 h dall'inizio dell'incubazione).
- Temperatura (°C) di incubazione.
- Intensità di luce (lux).
- Acqua pura utilizzata.
- Numero di organismi immobili osservati in ciascuna replica per il controllo e ogni diluizione di tossico.
- Valore di EC₅₀-24h ottenuto con un proprio metodo di calcolo o con il metodo dell'interpolazione grafica utilizzando il modulo semilogaritmico fornito dagli organizzatori.

4.3 Elaborazione statistica dei risultati

I risultati di ogni partecipante sono stati elaborati dagli organizzatori, utilizzando per il calcolo dell'EC₅₀ il metodo Probit. Per ogni laboratorio sono state ottenute quattro stime dell'EC₅₀ (una per ciascuna replica) e, sulla base delle norme ASTM E691-99 e ISO 5725-2 (1994), sono state calcolate la variabilità intra e interlaboratorio. Attraverso le statistiche *h* e *k* sono stati identificati i possibili *straggler* e *outlier*.

4.4 Risultati

Quarantatré laboratori hanno restituito i risultati della prova entro la data di scadenza prevista. Di questi uno ha fornito i risultati ottenuti da due diversi operatori e 6 laboratori hanno effettuato ciascuno due test con K₂Cr₂O₇, per totale di dati pervenuti diversi pari a 56.

Secondo i partecipanti, il protocollo operativo distribuito è risultato sufficientemente chiaro ed esaustivo e pochi laboratori (4/49) hanno segnalato l'esistenza di problemi nell'esecuzione delle diverse fasi del test. Due laboratori hanno apportato modifiche alla metodologia. Un laboratorio ha utilizzato per l'esposizione delle *Daphnie*, beker in vetro (40 ml) al posto delle piastre multipozzetto fornite. Un altro, avendo osservato un'elevata mortalità poiché gli ephippi rimanevano attaccati al parafilm di copertura della piastra multipozzetto, ha effettuato l'esposizione senza parafilm e senza coperchio.

II° Interconfronto Nazionale con *Daphnia magna*

Prova 2 (test con bicromato di potassio)

Laboratorio:
Operatore:
Data di esecuzione del test:

Schiusa:
gli organismi devono essere raccolti entro 90 ore dopo l'inizio dell'incubazione

accettabile (> 120 individui) non accettabile (< 120 individui)

Temperatura: °C ± °C
Illuminazione: lux

Acqua pura: <input type="checkbox"/> distillata <input type="checkbox"/> bidistillata <input type="checkbox"/> deionizzata <input type="checkbox"/> MilliQ <input type="checkbox"/> altro (specificare)	Concentrazioni bicromato (mg/L)	
	Nominale	Misurato*
	0,32	
	0,56	
	1,00	
	1,80	
	3,20	
	*specificare metodo	

Esposti (n. in ciascun pozzetto inizio test)					Risultati (n. immobili dopo 24 h)				
Pozzetti	A	B	C	D	Pozzetti	A	B	C	D
Fila X (acqua Iso Standard)	5	5	5	5	Fila X	1	0	0	0
Fila 1 (0,32 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ /L)	5	5	5	5	Fila 1	0	0	0	0
Fila 2 (0,56 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ /L)	5	5	5	5	Fila 2	0	0	0	1
Fila 3 (1,0 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ /L)	5	5	5	5	Fila 3	0	0	0	1
Fila 4 (1,8 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ /L)	5	5	5	5	Fila 4	4	5	4	4
Fila 5 (3,2 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ /L)	5	5	5	5	Fila 5	5	5	5	5
EC50:	1,4 mg/L								

Figura 4.1- Foglio raccolta dati con esempio

4.4.1 Schiusa degli ephippi

La resa della schiusa può essere influenzata dall'intensità luminosa e dalla temperatura.

Per quanto riguarda l'intensità luminosa, quattro laboratori non hanno indicato il valore utilizzato nelle proprie prove. Per i restanti 45 laboratori è stata registrata una intensità luminosa compresa tra un minimo di 5870 e un massimo di 9000 lux. Nella figura 4.2 è mostrata la correlazione tra intensità luminosa e sensibilità degli organismi al dicromato di potassio espressa come EC₅₀-24 h.

Dei 49 partecipanti uno solo non ne ha restituito il valore, per i restanti la temperatura è risultata compresa tra 20 e 22,8 °C. Nella figura 4.3 è mostrata la correlazione tra la temperatura e la sensibilità degli organismi al dicromato di potassio espressa come EC₅₀-24 h.

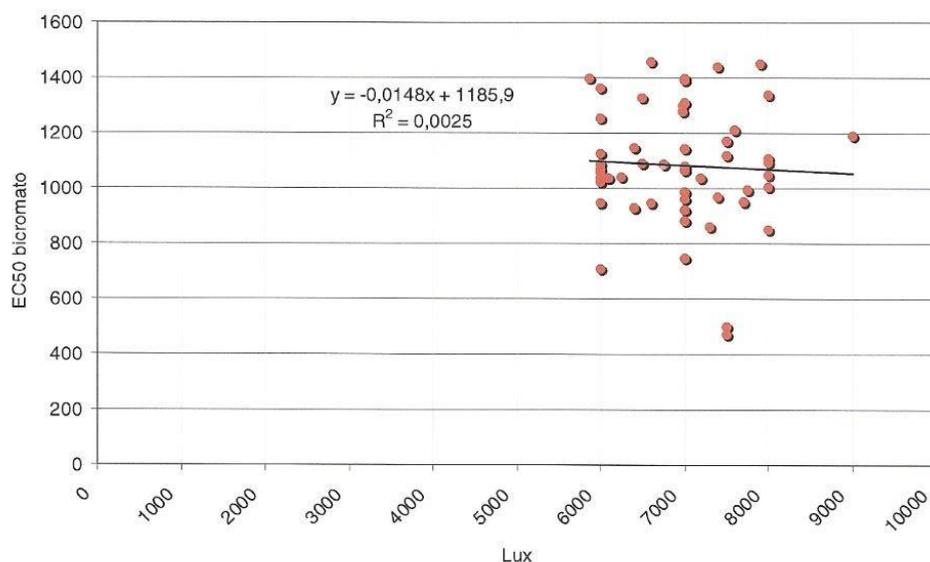


Figura 4.2 – Correlazione tra intensità luminosa e sensibilità di *Daphnia magna* al dicromato di potassio, espressa come $EC_{50-24 h}$

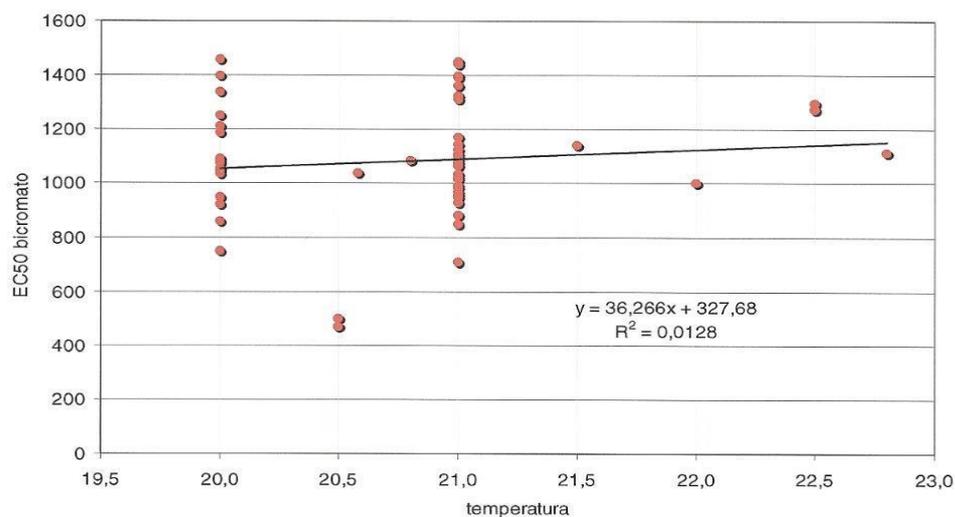


Figura 4.3 – Correlazione tra temperatura e sensibilità di *Daphnia magna* al dicromato di potassio, espressa come $EC_{50-24 h}$ (EC_{50} in $\mu\text{g/L}$)

Come si vede né la variabilità dell'intensità luminosa, né quella della temperatura hanno influenzato i risultati del test di tossicità ($R^2 = 0,0025$ e $0,0128$).

4.4.2 Prova 1 – Test di controllo di qualità dell'acqua pura

Tutti i laboratori tranne uno (che non ha eseguito nemmeno la prova 1) hanno inviato le informazioni relative al tipo di acqua pura utilizzata per la preparazione dell'acqua ISO Standard (figura 4.4).

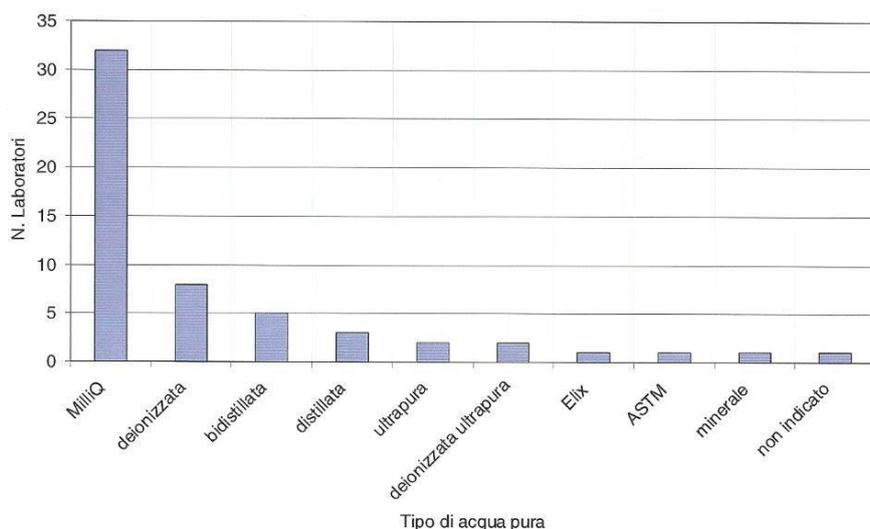


Figura 4.4 – *Tipi di acqua pura utilizzata dai laboratori partecipanti all'interconfronto*

Dieci laboratori hanno presentato una percentuale di mortalità diversa da zero (8 laboratori: 2,5% e 2 laboratori: 5%); tutti i dati rientrano nei criteri di accettabilità del test e non è stato evidenziato un errore sistematico associato ad uno specifico tipo di acqua pura.

4.4.3 Prova 2 – Test con dicromato di potassio

Nei 59 test acuti con dicromato di potassio in nessun caso è stato superato, nel controllo, il limite di effetto del 10% (più di 2 organismi immobili su 20 esposti). Sei laboratori (cod. n° 2, 5, 9, 10, 23, e 35) hanno ottenuto un effetto del 5% (1 organismo immobile su 20 esposti) ed altri 5 laboratori (cod. n° 1, 21, 34, 49 e 54) un effetto pari al 10% (2 organismi immobili su 20 esposti). Anche in questo caso non è stata evidenziata alcuna relazione causale con il tipo di acqua pura utilizzata per la preparazione dell'acqua ISO standard. Altre fonti di variabilità analizzate sono state: la data di esecuzione del test e le concentrazioni di dicromato utilizzate.

Per quanto riguarda il primo punto, i kit con gli organismi sono stati spediti ai partecipanti in tre tempi successivi (anche se ravvicinati, 1 settimana tra la prima e la terza spedizione). Presumibilmente, in funzione del diverso tempo di consegna ai laboratori e degli impegni lavorativi di questi, i test sono stati effettuati in un intervallo di tempo, a partire dall'ultima data di spedizione tra le 3 e le 4 settimane. Come evidenziato nella figura 4.5, non è stata trovata alcuna correlazione ($R^2 = 0,0042$) tra la data di esecuzione del saggio con dicromato di potassio e il suo risultato espresso come $EC_{50-24\text{ h}}$ in $\mu\text{g/L}$.

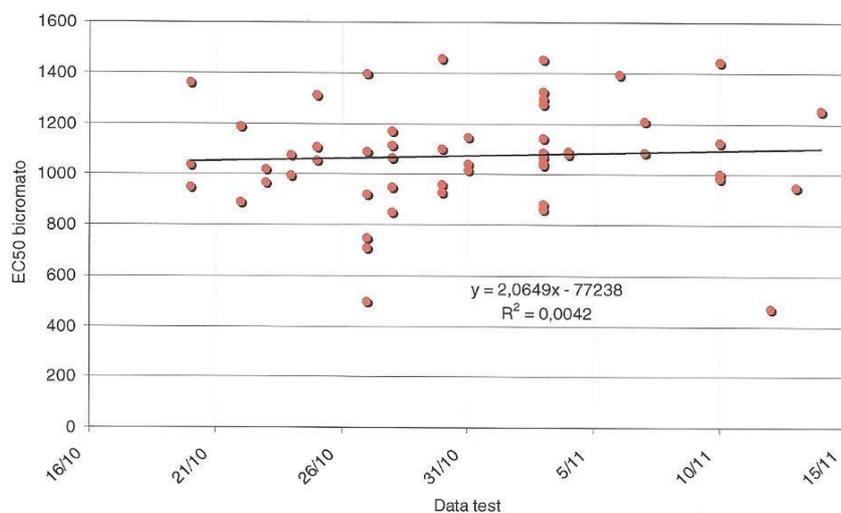


Figura 4.5 – *Correlazione tra tempo di esecuzione del test e suo risultato (EC_{50} in $\mu\text{g/L}$)*

Per quanto riguarda le concentrazioni del dicromato di potassio, il calcolo dell'EC_{50-24 h} è stato effettuato sulla base delle concentrazioni nominali della sostanza. Queste sono state preparate da ciascun laboratorio secondo la procedura descritta nel protocollo operativo, diluendo la quantità iniziale di 100 mg distribuita a ogni partecipante. In un solo caso è stato segnalato di aver ricevuto una fiala di K₂Cr₂O₇ contenente 80 mg, invece dei 100 mg previsti e di avere effettuato il test utilizzando il sale presente nel proprio laboratorio. Sette laboratori hanno verificato analiticamente le concentrazioni effettive delle soluzioni di dicromato di potassio. I risultati sono mostrati in tabella 4.2. Essi mostrano nella maggioranza dei casi un buon accordo tra concentrazioni nominali ed effettive.

Tabella 4.2 – Verifica analitica delle concentrazioni nominali di K₂Cr₂O₇ utilizzate nel saggio acuto con *Daphnia magna*.

Concentrazione Nominale (mg/L)	Concentrazioni determinate analiticamente (mg/L)						
	IRSA 3080 B1	IRSA 3080 B1	IRSA 3080 B1	ICP- OES	ICP-OES	AAS	Colorimetrico
0,32	0,34	0,32	0,40	0,33	0,33	-	0,32
0,56	0,56	0,56	0,60	0,57	0,60	-	0,55
1,00	0,99	1,00	1,10	1,02	1,05	0,84	0,99
1,80	1,79	1,80	2,00	1,83	1,89	-	1,79
3,20	3,13	3,10	3,53	3,25	3,31	-	3,17

Nella tabella 4.3 sono riportati tutti i risultati originali (numero di organismi immobili/concentrazione) pervenuti dai laboratori nel saggio di tossicità acuta con dicromato di potassio. Le concentrazioni utilizzate sono quelle mostrate nella prima colonna di tabella 3. I valori di EC_{50-24 h} con l'intervallo di confidenza al 95% sono calcolati dagli organizzatori del confronto con il metodo Probit e sono espressi in µg/L. Tre laboratori hanno presentato valori di EC_{50-24 h} (500 µg/L, 470 µg/L e 530 µg/L) inferiori rispetto all'intervallo di accettabilità (0,6 -2,1 mg/L) previsto dalla norma UNI CEN ISO 6341 e per questo motivo sono stati esclusi dall'elaborazione statistica e dal calcolo del valore medio (tabella 4.4).

Tabella 4.3 – Risultati dei laboratori partecipanti al saggio di tossicità acuta (24 h) con forme criptobiotiche di *Daphnia magna* esposte al tossico dicromato di potassio (K₂Cr₂O₇). I valori di EC_{50-24 h} sono stati calcolati dagli organizzatori con il metodo Probit e sono espressi in µg/L per permettere un più agevole confronto con la figura 5.

Concentrazioni K ₂ Cr ₂ O ₇ (mg/L)	N° immobili				EC ₅₀₋₂₄ h (□24 h)	L inf	L sup
	A	B	C	D			
0,00	0	0	0	0	1050	870	1240
0,32	0	0	0	0			
0,56	1	0	0	0			
1	1	2	2	1			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1040	990	1090
0,32	0	0	0	0			
0,56	1	0	0	0			
1	1	2	2	1			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	890	710	1070
0,32	0	0	0	1			
0,56	1	0	1	1			
1	3	2	3	3			
1,8	5	5	5	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1400	1160	1630
0,32	1	0	0	0			
0,56	1	2	0	0			
1	2	2	2	2			
1,8	2	3	2	3			
3,2	4	4	5	5			
0,00	1	0	0	0	1040	1000	1070
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	1	1	1			
1	1	2	1	1			
1,8	5	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	1	1	950	800	1100
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	1	0			

1	4	3	2	1			
1,8	4	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1090	590	1590
0,32	0	0	0	0			
0,56	1	2	1	1			
1	2	1	1	4			
1,8	4	2	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1400	1110	1680
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	1	1	0			
1	1	2	2	2			
1,8	3	2	3	2			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	1	0	1	920	560	1280
0,32	0	0	0	1			
0,56	0	0	0	1			
1	1	1	4	3			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	1	0	0	0	750	260	1240
0,32	0	0	0	1			
0,56	0	1	0	3			
1	2	5	3	5			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	760	1630	1880
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	0			
1	1	0	1	1			
1,8	2	3	2	1			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1320	840	1800
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	1			
1	0	0	1	1			
1,8	4	4	5	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	950	760	1130
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	1			
1	4	3	3	3			
1,8	5	5	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1280	1010	1540
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	0			
1	1	1	1	1			
1,8	4	4	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	1	1	500	350	650
0,32	1	0	0	1			
0,56	4	3	1	3			
1	4	5	5	5			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	470	380	600
0,32	1	0	1	1			
0,56	3	5	2	4			
1	5	5	5	4			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1360	610	2110
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	0			
1	1	3	0	5			
1,8	3	2	3	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	1	1020	910	1130
0,32	0	0	0	0			
0,56	1	0	0	0			
1	3	2	1	1			
1,8	4	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1300	680	1910

0,32	0	0	1	0			
0,56	1	0	0	0			
1	1	1	2	2			
1,8	4	2	5	3			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1444	1050	1840
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	0			
1	1	1	0	0			
1,8	3	4	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1140	810	1470
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	1			
1	1	1	2	2			
1,8	4	5	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	880	570	1190
0,32	1	0	0	1			
0,56	1	1	0	2			
1	3	3	1	2			
1,8	5	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1190	630	1740
0,32	1	0	0	0			
0,56	0	1	0	0			
1	2	2	1	1			
1,8	5	5	3	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1100	540	1660
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	1	0			
1	1	2	3	2			
1,8	3	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1450	790	2110
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	1			
1	0	2	0	0			
1,8	3	5	4	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1310	1020	1600
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	1	0			
1	2	1	1	2			
1,8	4	3	3	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	950	790	1100
0,32	0	1	0	1			
0,56	0	0	0	0			
1	3	3	2	2			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1040	940	1130
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	0			
1	1	2	3	3			
1,8	5	5	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1340	750	1920
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	1	1			
1	0	2	1	2			
1,8	3	3	4	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1080	1070	1080
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	1	0			
1	1	1	0	1			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1330	690	1960
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	1			
1	1	0	1	1			
1,8	5	4	3	5			

3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1110	720	1490
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	2	1			
1	2	1	1	3			
1,8	4	4	5	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1000	710	1290
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	2	1	1			
1	2	3	2	1			
1,8	4	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	1	0	0	0	530	420	630
0,32	3	1	0	1			
0,56	0	4	3	2			
1	5	3	4	5			
1,8	5	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	860	600	1120
0,32	0	0	1	0			
0,56	2	0	1	0			
1	4	3	3	3			
1,8	4	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	1	1400	600	2190
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	0			
1	0	3	0	1			
1,8	3	4	3	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	1	0	0	960	790	1130
0,32	1	1	0	1			
0,56	1	0	1	1			
1	0	2	1	1			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1080	880	1250
0,32	0	0	0	1			
0,56	2	0	0	0			
1	1	2	3	2			
1,8	3	5	5	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1460	1180	1740
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	0			
1	1	0	1	2			
1,8	4	4	3	3			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1030	1000	1070
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	1	0			
1	2	3	1	2			
1,8	5	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1170	920	1420
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	1			
1	1	1	2	2			
1,8	5	4	4	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1080	740	1430
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	1			
1	1	0	2	3			
1,8	5	5	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	930	810	1040
0,32	0	0	0	0			
0,56	1	2	1	0			
1	2	2	2	3			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	990	910	1070
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	1	0	0			

1	2	3	2	3			
1,8	5	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1070	660	1470
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	1	0	1			
1	1	3	2	2			
1,8	4	5	5	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1120	840	1410
0,32	0	0	0	0			
0,56	1	0	1	0			
1	2	2	2	2			
1,8	4	3	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	970	880	1050
0,32	0	1	1	0			
0,56	1	0	0	0			
1	3	3	1	3			
1,8	5	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	1	0	0	1	1070	710	1440
0,32	1	0	1	0			
0,56	0	0	0	1			
1	2	0	2	1			
1,8	3	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1120	750	1480
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	2			
1	2	1	3	1			
1,8	4	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1040	830	1260
0,32	0	0	1	0			
0,56	0	1	0	0			
1	3	1	2	3			
1,8	4	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	1	0	0	0	1090	950	1230
0,32	1	0	0	0			
0,56	1	1	0	0			
1	1	2	2	2			
1,8	4	4	4	5			
3,2	4	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1210	910	1510
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	0			
1	1	1	1	1			
1,8	5	4	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1250	840	1670
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	0	0	0			
1	1	1	1	1			
1,8	5	3	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	1	1	710	280	1140
0,32	0	0	2	1			
0,56	0	1	2	1			
1	3	4	4	3			
1,8	5	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1140	700	1590
0,32	0	0	1	0			
0,56	1	0	0	0			
1	2	1	2	0			
1,8	5	4	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1090	580	1590
0,32	0	1	0	0			

0,56	0	0	0	0			
1	2	4	1	0			
1,8	5	5	4	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	980	620	1350
0,32	0	0	0	0			
0,56	0	1	0	0			
1	2	5	3	2			
1,8	5	4	5	4			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	850	380	1320
0,32	0	0	0	2			
0,56	0	0	1	2			
1	3	3	3	4			
1,8	4	5	5	5			
3,2	5	5	5	5			
0,00	0	0	0	0	1020	920	1110
0,32	0	0	0	0			
0,56	1	0	1	1			
1	3	2	2	1			
1,8	4	5	4	5			
3,2	5	5	5	5			

In figura 4.6 sono mostrati graficamente i valori di $EC_{50-24\text{ h}}$, con le rispettive variabilità, ottenuti dai laboratori che hanno partecipato alla prova di tossicità acuta con forme criptobiotiche di *Daphnia magna* esposte al tossico dicromato di potassio.

Sulla base delle norme ASTM E691-1999 e ISO 5752-2 (1994), è stata applicata la statistica h e k per l'identificazione degli *straggler* e degli *outlier*. La statistica k ha permesso di verificare se la variabilità intralaboratorio di ogni partecipante (tra le sue 4 repliche) si scostasse in maniera significativa dalla variabilità intralaboratorio complessiva calcolata per tutti i laboratori. La statistica h , invece, ha permesso di rilevare se i risultati di ogni singolo laboratorio fossero statisticamente differenti da quelli di tutti gli altri laboratori. Come mostrato nella figura 4.6, i laboratori 48 e 49 sono risultati *outlier*, mentre i laboratori 9 e 19 sono risultati *straggler*.

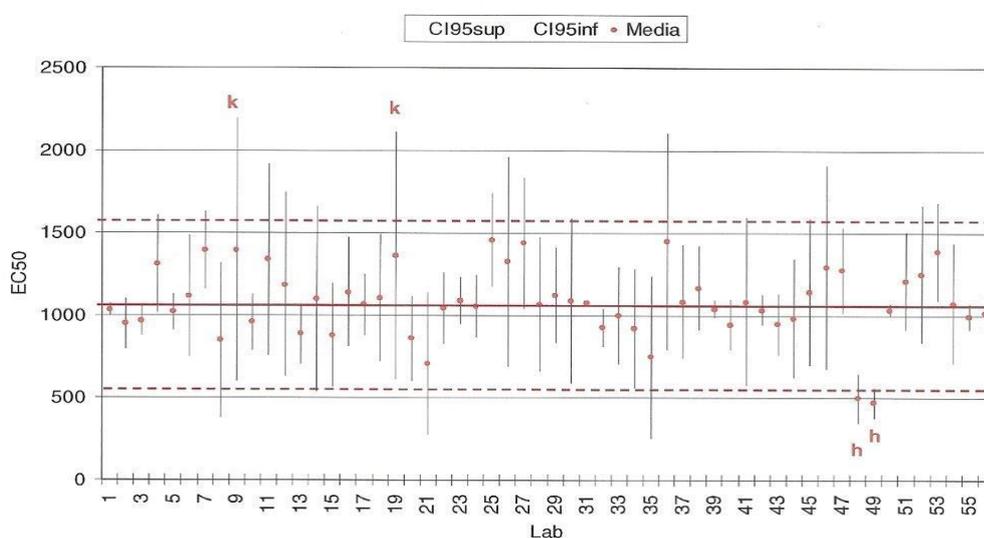


Figura 4.6 – Risultati dell'interconfronto: valori di $EC_{50-24\text{ h}}$, con le rispettive variabilità, ottenuti dai laboratori partecipanti con forme criptobiotiche di *Daphnia magna* esposte al tossico dicromato di potassio ($EC_{50-24\text{ h}}$ in $\mu\text{g/L}$). Sono indicati anche gli outlier h e k

In tabella 4.4 sono riassunti i risultati dell'elaborazione statistica effettuata sui valori di $EC_{50-24\text{ h}}$ ottenuti nella prova di tossicità acuta con forme criptobiotiche di *Daphnia magna* esposte al tossico dicromato di potassio. L'eliminazione dei valori *outlier* non influenza il valore medio di $EC_{50-24\text{ h}}$, ma comporta un sensibile miglioramento della variabilità intra (CV_r da 17,14% a 15,40%) e interlaboratorio (CV_R da 24,52% a 20,36%).

Tabella 4.4– Risultati dell'elaborazione statistica dei valori di EC_{50-24} h (in mg/L) e variabilità intra e interlaboratorio

Parametro	Tutti i dati	Senza outlier h e k
<i>n</i>	56	50
n° repliche	4	4
media EC_{50-24} h (µg/L)	1,078	1,077
S_r	0,184	0,166
$CV_r\%$	17,14	15,40
S_R	0,264	0,219
$CV_R\%$	24,52	20,36
<i>h straggler</i>	2	4
<i>h outlier</i>	2	0
<i>k straggler</i>	5	4
<i>k outlier</i>	2	0

Abbreviazioni: CV%: coefficiente di variazione percentuale; *n*: numero di dati; S_r : ripetibilità intralaboratorio; S_R : riproducibilità interlaboratorio;

4.5 Considerazioni conclusive

Il primo confronto interlaboratorio con *Daphnia magna* organizzato dall'allora APAT nel 2002, aveva utilizzato come protocollo per l'esecuzione del test, la procedura della norma ISO CEN UNI 6341:1998 applicandola sia a crostacei d'allevamento che a forme criptobiotiche. Questa scelta era giustificata dalla proposta, da parte di AFNOR, di utilizzare per la determinazione della tossicità cronica breve (7 giorni) con *Daphnia*, anche organismi provenienti dalla schiusa di ephippi (ISO/CD 20664, paragrafo 6.1).

In seguito al ritiro della norma ISO/CD 20664 (riunione del gruppo tecnico ISO/TC/SC 5/WG 2 "Toxicity – Invertebrates" del 13 giugno 2002) per divergenze in merito ai contenuti tecnici del test di tossicità cronica breve e in mancanza di un metodo normato e/o ufficiale che contemplasse l'uso di forme criptobiotiche di *Daphnia magna*, si è proceduto, in occasione di questo interconfronto a modificare il protocollo ISO UNI CEN 6341:1998 *ad hoc* per includere l'uso delle forme criptobiotiche dell'organismo.

I risultati ottenuti ($n=56$) indicano che tale protocollo permette di ottenere una stima della tossicità acuta (EC_{50-24} h) con dicromato di potassio pari a 1,078 mg/L (valore medio). Questo valore rientra nel campo della variabilità accettabile secondo ISO CEN UNI 6341 (0,6 – 2,1 mg/L). I coefficienti di variazione percentuale intralaboratorio e interlaboratorio sono risultati pari a 15,40% e 20,36%, rispettivamente.

Ai fini di un confronto, si ricorda che la suddetta norma ISO riporta, per 36 laboratori partecipanti (2 outlier), un valore di EC_{50-24} h medio pari a 1,12 mg/L di $K_2Cr_2O_7$ con una ripetibilità intralaboratorio del 5% e una variabilità interlaboratorio pari al 50%.

4.6 Riferimenti

- ISO CEN UNI 6341(1998) Qualità dell'acqua – Determinazione dell'inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Prova di tossicità acuta.
- ASTM E691-14 (1999) Standard Practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method.
- ISO 5752-2 (1994) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- ISO/CD 20664 Water quality – Determination of chronic toxicity to *Daphnia magna* Straus in 7 days – Simplified population growth inhibition test.
- ISO 10706 (2000) Water quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).

5. “APAT IC006” TEST DI TOSSICITÀ ACUTA CON *DAPHNIA MAGNA*

Scopo	Valutazione della variabilità intra ed inter laboratorio del saggio di tossicità acuta con <i>Daphnia magna</i>, secondo ISO UNI CEN 6341:1998⁵ e protocollo APAT e CNR-IRSA.
Saggio Tossico di riferimento Tossico cieco Sistema di saggio	Tossicità acuta 24 ore (h) con tossico di riferimento e tossico cieco con organismi provenienti da forme criptobiotiche (uova durature o ehippi) e allevamento. Dicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) cloruro di potassio (KCl). Neonati (< 24 h) di <i>Daphnia</i> sono esposti ad almeno cinque concentrazioni di tossico (di riferimento o cieco) per un periodo di 24 ore.
Numero di Partecipanti	*70: ARPA/APPA e laboratori afferenti a istituzioni pubbliche e private.
Valore di consenso	EC50 ottenuto dalla elaborazione dei valori calcolati per ciascun laboratorio, escluso il caso di quelli forniti per un numero di repliche inferiori a 4.
Dettagli del saggio	La risposta del sistema di saggio viene valutata come EC50-24 h (ISO 6341) ovvero come concentrazione iniziale (presente all’inizio del test) che in 24 ore immobilizza il 50% degli organismi esposti.

* La lista completa dei laboratori aderenti è riportata nelle tabelle 5.1 e 5.2 . Su 74 adesioni complessive, 70 laboratori (51 ARPA/APPA e 19 di altre Istituzioni) hanno trasmesso i risultati finali richiesti. A ciascuno dei 70 laboratori è stato assegnato un codice identificativo cui sono associati anche i risultati restituiti ed elaborati.

5.1 Materiali

Il materiale di prova è un campione cieco con 1 g di cloruro di potassio. Le aliquote distribuite sono state preparate partendo da 200 g di KCl (J.T. Baker “Potassium Chloride crystal”, ultrapure, n° CAS 7447-40-7). Prima della suddivisione in 110 fiale da 1 g, il sale è stato essiccato a 105 °C fino a peso costante e successivamente omogeneizzato.

Come tossico di riferimento, dicromato di potassio, ciascun partecipante, ha utilizzato il sale in dotazione presso il proprio laboratorio. Il tossico è stato utilizzato per la verifica della mobilità e della vitalità degli organismi.

Tabella 5.1 – Laboratori ARPA/APPA partecipanti alla prova valutativa APAT IC006

Ente	Città
ARTA Abruzzo	Teramo
ARTA Abruzzo	L’Aquila
ARTA Abruzzo	Pescara
ARTA Abruzzo	Chieti
ARPA Campania	Salerno
ARPA Campania	Napoli
ARPA Emilia Romagna	Ravenna
ARPA Emilia Romagna	Reggio Emilia
ARPA Emilia Romagna	Modena
ARPA Emilia Romagna	Ferrara
ARPA Emilia Romagna	Forlì
ARPA Emilia Romagna	Rimini
ARPA Emilia Romagna	Ferrara
ARPA Friuli Venezia Giulia	Gorizia
ARPA Friuli Venezia Giulia	Pordenone
ARPA Lazio	Latina

⁵ La prova è stata organizzata dal Servizio di metrologia ambientale e da ARPA Veneto nell’ambito del progetto “Circuiti di interconfronto per l’individuazione di un gruppo tecnico permanente regionale o multi regionale (GTP) per il monitoraggio continuo della qualità dei dati prodotti dai laboratori regionali che svolgono attività di controllo ambientale” Agenzie al momento componenti del GTP: ARTA-Abruzzo, ARPA-Basilicata, ARPA-Calabria, ARPA-Campania, ARPA-Emilia Romagna, ARPA-Friuli Venezia Giulia, ARPA-Lazio, ARPA-Liguria, ARPA-Lombardia, ARPA-Marche, ARPA-Molise, ARPA-Piemonte, ARPA-Puglia, ARPA-Sardegna, ARPA-Sicilia, ARPA-Toscana, APPA-Trento, ARPA-Umbria, ARPA-Val d’Aosta, ARPA-Veneto.

ARPA Liguria	La Spezia
ARPA Lombardia	Cremona
ARPA Lombardia	Milano
ARPA Lombardia	Mantova
ARPA Lombardia	Varese
ARPA Lombardia	Pavia
ARPA Marche	Macerata
ARPA Molise	Isernia
ARPA Molise	Campobasso
ARPA Piemonte	Torino
ARPA Piemonte	Verbania
ARPA Piemonte	Vercelli
ARPA Piemonte	Cuneo
ARPA Puglia	Lecce
ARPA Puglia	Brindisi
ARPA Puglia	Foggia
ARPA Sicilia	Messina
ARPA Sicilia	Palermo
ARPA Sicilia	Palermo
ARPA Sardegna	Cagliari
ARPA Sardegna	Sassari
ARPA Toscana	Grosseto
ARPA Toscana	Pisa
ARPA Toscana	Arezzo
ARPA Toscana	Livorno
ARPA Toscana	Livorno
ARPA Toscana	Prato
ARPA Toscana	Lucca
ARPA Toscana	Massa
ARPA Trentino	Bolzano
ARPA Umbria	Perugia
ARPA Veneto	Treviso
ARPA Veneto	Belluno
ARPA Veneto	Vicenza
ARPA Veneto	Venezia
ARPA Veneto	Rovigo
ARPA Veneto	Verona
Val D'Aosta	Aosta

Tabella 5.2 – *Laboratori di altre istituzioni partecipanti alla prova valutativa APAT IC006*

Ente	Città
CNR-ISE	Verbania
Shoreline	Trieste
Acq. pugliese	Bari
Cesi SpA	Piacenza
Università Napoli	Napoli
Chemservice S.r.l.	Milano
Università Milano	Lodi
Agrobios	Matera
ISIRIM	Terni
HERA SpA	Bologna
Laboratorio Ambientale	Buscate (MI)
Acq. Flumendosa	Cagliari
AMAP SpA	Palermo
Consorzio Dep. Alto Toce	Gravellona Toce (VB)
Fenice SpA	Rivoli (TO)
Azienda Prov.le Servizi Sanitari	Trento
Ist. Zooprofilattico	Teramo
SIAD SpA	Dalmine (BG)
II Università Napoli	Caserta
VESPA SpA	Venezia

5.2 Disegno sperimentale

Esecuzione del saggio con diverse tipologie di organismi per la valutazione dell'accettabilità e della precisione dei metodi utilizzati in termini di ripetibilità e riproducibilità sulla base dei valori di EC₅₀ -24 h.

Metodi da utilizzare:

- organismi da forme criptobiotiche (uova durature o ehippi), applicazione del protocollo APAT-CNR-IRSA del 2003 (volume 3 n. 29)
- organismi da allevamento metodo normalmente in uso al laboratori

5.3 Test di tossicità acuta 24 ore con *Daphnia magna*

5.3.1 Principio del saggio

Neonati (< 24 h) di *Daphnia* sono esposti ad almeno cinque concentrazioni di tossico (di riferimento o cieco) per un periodo di 24 ore. La risposta del sistema di saggio viene valutata come concentrazione iniziale (cioè presente all'inizio del test) che in 24 ore immobilizza il 50% degli organismi esposti. EC₅₀-24 h (ISO 6341).

5.3.2 Organismi

Il sistema di saggio è costituito da neonati di *Daphnia magna* Straus nati da meno di 24 ore. Nella tabella 5.3 è riportato per ciascun partecipante la tipologia di provenienza degli organismi utilizzati.

Tabella 5.3. – Tipologie di organismi utilizzati dai 70 laboratori che hanno restituito i risultati delle prove

Codice laboratorio	Origine degli organismi	Codice laboratorio	Origine degli organismi	Codice laboratorio	Origine degli organismi
1	AL	31	AL e KIT	61	AL
2	AL e KIT	32	KIT	-	-
3	AL e KIT	33	KIT	63	AL
4	AL e KIT	34	AL	64	KIT
5	KIT	35	KIT	65	KIT
6	KIT	36	KIT	66	KIT
7	KIT	37	AL	-	-
8	KIT	38	KIT	68	AL
9	KIT	39	AL e KIT	69	AL
10	KIT	40	AL	70	KIT
11	AL	41	AL	71	KIT
-	-	42	KIT	72	AL
13	KIT	43	AL	73	AL
14	KIT	44	AL	74	AL
15	AL	45	KIT		
16	KIT	46	KIT		
17	KIT	-	-		
18	AL	48	KIT		
19	KIT	49	AL		
20	AL	50	AL		
21	AL	51	AL		
22	AL	52	AL		
23	KIT	53	AL		
24	AL	54	KIT		
25	KIT	55	KIT		
26	KIT	56	KIT		
27	KIT	57	AL		
28	KIT	58	AL		
29	AL	59	KIT		
30	KIT	60	KIT		

Abbreviazioni: AL: Solo allevamento (29 laboratori); KIT: Solo forme criptobiotiche (36 laboratori); AL e KIT: sia allevamento che forme criptobiotiche (5 laboratori).

I quarantuno laboratori che hanno impiegato le forme criptobiotiche dell'organismo di prova hanno eseguito il saggio secondo le indicazioni del protocollo come richiesto

Dei trentaquattro laboratori che hanno impiegato organismi d'allevamento 14 hanno utilizzato il metodo APAT-IRSA (2003), 8 laboratori hanno utilizzato il metodo UNI EN ISO 6341 (1999), 1 ha impiegato un metodo interno non specificato, e 11 laboratori non hanno fornito alcuna indicazione, vedi tabella 5.4. Cinque laboratori (cod. n° 2, 3, 4, 31 e 39) hanno eseguito la prova anche con le forme criptobiotiche.

Tabella 5.4 – Metodi di prova utilizzati dai L_{AL}

Codice laboratorio	Metodo impiegato	Codice laboratorio	Metodo impiegato
1	NR	41	UNI EN ISO 6341
2	NR	43	APAT-IRSA 2003
3	APAT-IRSA 2003	44	UNI EN ISO 6341
4	APAT-IRSA 2003	49	-
11	UNI EN ISO 6341	50	APAT-IRSA 2003
15	APAT-IRSA 2003	51	-
18	APAT-IRSA 2003	52	-
20	APAT-IRSA 2003	53	APAT-IRSA 2003
21	APAT-IRSA 2003	57	UNI EN ISO 6341
22	UNI EN ISO 6341	58	-
24	APAT-IRSA 2003	61	APAT-IRSA 2003
29	-	63	-
31	UNI EN ISO 6341	68	UNI EN ISO 6341
34	APAT-IRSA 2003	69	-
37	APAT-IRSA 2003	72	-
39	UNI EN ISO 6341	73	APAT-IRSA 2003
40	Metodo interno	74	-

Abbreviazioni: NR non riportato

5.3.3 Restituzione dei risultati

I laboratori hanno riportato nella scheda dei risultati, il numero di organismi immobili/morti per replica, per ognuna delle prove effettuate, sia con tossico cieco che con tossico di riferimento, 41 laboratori hanno fornito i risultati (L_{KIT}) ottenuti eseguendo i protocollo APAT-IRSA-CNR del 2003 (forme criptobiotiche); 34 i risultati (L_{AL}) ottenuti impiegando i metodi come indicato nella tabella 5.3 (organismi d'allevamento) I valori di EC_{50-24h} di ogni laboratorio sono stati calcolati dagli organizzatori, utilizzando un unico metodo statistico.

5.4 Elaborazione statistica dei risultati

I valori che sono stati sottoposti ad elaborazione statistica, sono i valori di $EC_{50-24 h}$, è stato utilizza un unico modello di calcolo (Trimmed Spearman-Kärber Version 1.5) a partire dal numero di organismi immobili/morti fornito dai laboratori e dalle concentrazioni di tossici da loro impiegate. Per i calcoli è stato utilizzato il software CETIS (TidePool Scientific Software) che si basa sul modello USEPA Trimmed Spearman-Kärber v.1.5.

Sono stati inoltre adoperati i seguenti test statistici:

- statistica h valuta la variabilità inter-laboratorio [ASTM E691-1999 e ISO 5725-2, 1994]
- statistica k valuta la variabilità intra-laboratorio [ASTM E691-1999 e ISO 5725-2, 1994]
- Z – score per la valutazione di accettabilità [ISO/DIS 13528:2002 (E)]
- grafico Youden per la valutazione degli scostamenti sistematici per i laboratori che hanno determinato le concentrazioni dei tossici con metodi diversi (concentrazione nominale/concentrazione misurata)

Le statistiche h e k (statistica di consistenza dei dati) danno una informazione generale sulla variabilità dei dati (all'interno di un laboratorio e tra laboratori) forniti dai laboratori. Il valore della statistica h per ogni laboratorio si ottiene dalla equazione:

$$h = \frac{X_{LAB} - \bar{X}}{\sigma_{\bar{X}}}$$

dove X_{LAB} = valore medio del parametro ottenuto dal laboratorio

\bar{X} = media delle medie di tutti i laboratori
 $\sigma_{\bar{X}}$ = scarto tipo delle medie di tutti i laboratori

Il valore della statistica k per ogni laboratorio si ottiene dalla equazione: $k = \frac{\sigma_{LAB}}{\sigma_r}$

dove: σ_{LAB} = scarto tipo della media del laboratorio $\sigma_{LAB} = \left(\frac{EC_{50}Max - EC_{50}Min}{\sqrt{n}} \right) n = 4$

σ_r = scarto tipo di ripetibilità $\sigma_r = \sqrt{\sum_{i=1}^{p-1} \sigma_{LAB_i}^2} / (p-1)$ p = numero di laboratori partecipanti

Infine si calcola lo scarto tipo di riproducibilità: $\sigma_R = \sqrt{\sigma_{LAB}^2 + \sigma_r^2 \cdot (n-1)/n}$

I valori critici di h dipendono dal numero di laboratori partecipanti al circuito, mentre i valori critici di k dipendono dal numero di laboratori e dal numero di repliche effettuate da ogni laboratorio. I valori critici sono calcolati per un livello di confidenza pari al 5 e all'1% [ISO 5725-2, 1994]. Se i valori di h o k per un laboratorio sono:

- minori o uguali al valore critico valutato ad un livello di confidenza pari al 5% il dato è accettato;
- se h o k sono maggiori del valore critico ad un livello di confidenza pari al 5% ed inferiori od uguali al valore critico valutato ad un livello di confidenza pari ad 1% il dato è definito straggler;
- se h o k sono maggiori del valore critico ad un livello di confidenza di 1% il dato è definito "outliers".

Lo Z-score è calcolato secondo l'equazione:

$$\frac{X_{LAB} - X_{RIF}}{\sigma_{RIF}}$$

dove: X_{RIF} = valore di consenso del parametro [ISO/13528:2005].

σ_{RIF} = scarto tipo robusto del CI [ISO 13528:2005].

La valutazione dell'accettabilità dei valori EC_{50} di ciascun laboratorio è effettuata sulla base dei punteggi Z-score [ISO 13528:2005].

$ Z $	≤ 2 accettabile
$ Z $	< 3 discutibile
$ Z $	≥ 3 non accettabile

Per la definizione del valore di consenso di parametro (EC_{50}) sono stati elaborati tutti i valori calcolati per ciascun laboratorio, esclusi quelli che hanno riportato un numero di repliche inferiori a 4. I laboratori che non hanno riportato i dati di mobilità/mortalità relativi a 4 repliche, secondo la specifica del protocollo della prova valutativa, non sono stati considerati nell'elaborazione statistica.

I dati di EC_{50} sono stati successivamente raggruppati in sottogruppi sulla base della provenienza degli organismi e del metodo di analisi utilizzato. I diversi gruppi sono stati confrontati a due a due utilizzando il test t di Student per verificare se le medie ottenute con i diversi metodi utilizzati possono essere considerate uguali tra loro.

In particolare è stato applicato il test t per campioni indipendenti (o non appaiati) assumendo uguale varianza previa dimostrazione della omoschedasticità, cioè che le due varianze siano statisticamente uguali, tramite il test F di Fisher.

Il valore di t nel caso di due campioni indipendenti ha i gradi di libertà uguali a $(n_1-1)+(n_2-1)$, ossia (n_1+n_2-1) dove n_1 è il numero di osservazioni nel primo campione e n_2 è il numero di osservazioni nel secondo campione, ed è ottenuto mediante la formula:

$$t_{n_1+n_2-1} = \frac{(x_1 - x_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{s_p^2 \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

dove: x_1 e x_2 sono le medie rispettivamente del campione 1 e del campione 2,
 μ_1 e μ_2 sono le rispettive medie attese, espresse nell'ipotesi nulla,
 n_1 e n_2 sono il numero di osservazioni nei campioni 1 e 2,
 s_p^2 è la varianza associata (*pooled*) dei due gruppi a confronto.

$$s_p^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_1} (x_{1i} - x_1)^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (x_{2i} - x_2)^2}{n_1 - 1 + n_2 - 1}$$

La varianza *pooled* è una varianza media ponderata che attribuisce una importanza proporzionalmente maggiore al gruppo che ha un numero maggiore di dati.

Condizione essenziale di validità del test t di Student è che i dati siano distribuiti normalmente e le osservazioni siano raccolte in modo indipendente; nel caso di due campioni indipendenti, per calcolare la varianza *pooled* si ha l'ulteriore condizione essenziale di omoschedasticità, cioè che le due varianze siano statisticamente uguali. Il metodo di verifica dell'ipotesi di omoschedasticità è fondato sul rapporto tra la varianza campionaria maggiore e la varianza campionaria minore (test F). Qualora l'omoschedasticità non sia stata confermata si è proceduto confrontando i gruppi con il t test per campioni indipendenti assumendo varianze diverse.

In questo caso:

$$t_{gdl} = \frac{(x_1 - x_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}}$$

dove: x_1 e x_2 sono le medie rispettivamente del campione 1 e del campione 2,
 μ_1 e μ_2 sono le rispettive medie attese, espresse nell'ipotesi nulla,
 n_1 e n_2 sono il numero di osservazioni nei campioni 1 e 2,
 s_1^2 e s_2^2 sono le varianze rispettivamente del campione 1 e del campione 2.

I gradi di libertà (gdl) sono determinati tramite l'equazione:
$$gdl = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1 - 1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2 - 1}}$$

5.5 Risultati

I laboratori, L_{KIT} e L_{AL}, hanno fornito il numero di organismi immobili/morti ottenuti al termine delle seguenti prove:

L _{KIT}	K ₂ Cr ₂ O ₇	•test con soluzioni a concentrazioni nominali di 0,32-0,56-1,00-1,80 - 3,20 mg/L e controllo negativo (acqua ISO Standard)
	K ₂ Cr ₂ O ₇	•test con soluzioni a concentrazioni simili a quelle sopra riportate, ma con valori determinati sperimentalmente (concentrazioni misurate) e controllo negativo (acqua ISO Standard)
	KCl	•test con 5 diverse soluzioni di cloruro di potassio (tossico cieco) con concentrazioni scelte da ciascun laboratorio sulla base del test preliminare e

L_{AL}	$K_2Cr_2O_7$	controllo negativo (acqua ISO Standard) •test con 5 soluzioni alle concentrazioni nominali previste dal metodo utilizzato o stabilite con il test preliminare e controllo negativo (acqua di diluizione o di allevamento)
	$K_2Cr_2O_7$	•test con 5 soluzioni di alle concentrazioni previste dalla procedura utilizzata, il cui valore è stato determinato sperimentalmente (concentrazioni misurate) e controllo negativo (acqua di diluizione o di allevamento)
	KCl	•test con 5 soluzioni con concentrazioni scelte da ciascun laboratorio sulla base del test preliminare e controllo negativo (acqua di diluizione o di allevamento)

Per l'elaborazione statistica, sono stati considerati solo i risultati dei saggi definitivi. I laboratori che non hanno riportato i risultati relativi alle 4 repliche previste, sono stati esclusi.

I risultati pervenuti sono stati analizzati nel seguente ordine:

- Risultati dei L_{KIT}
 - relativi al tossico di riferimento, dicromato di potassio, con concentrazioni misurate e concentrazioni nominali;
 - relativi al tossico cieco, cloruro di potassio
- Risultati dei L_{AL}
 - relativi al tossico di riferimento, dicromato di potassio, con concentrazioni misurate e concentrazioni nominali;
 - relativi al tossico cieco, cloruro di potassio
- Confronto dei risultati ottenuti con valori di concentrazioni dei tossici determinati con le concentrazioni misurate e le concentrazioni nominali.

I valori di EC_{50} - 24 h espressi come mg/L ($K_2Cr_2O_7$, tossico di riferimento) e g/L (KCl, tossico cieco) sono stati calcolati con il metodo USEPA Trimmed Spearman-Kärber v.1.5. utilizzando come risultati il numero di organismi immobili osservati al termine delle prove e le concentrazioni di dicromato e cloruro di potassio utilizzate.

I L_{KIT} hanno effettuato le seguenti prove: 41 laboratori hanno effettuato la prova con il tossico cieco; 40 laboratori hanno effettuato anche le analisi con tossico di riferimento considerando le concentrazioni nominali e 16 di questi 40 laboratori hanno effettuato la prova considerando anche le concentrazioni misurate. Il laboratorio 2 non ha effettuato le prove con il tossico di riferimento.

I L_{AL} hanno effettuato le seguenti prove: 32 laboratori hanno effettuato la prova con il tossico cieco; 33 laboratori hanno effettuato le analisi con tossico di riferimento considerando le concentrazioni nominali e 16 di questi 33 laboratori hanno effettuato la prova considerando anche le concentrazioni misurate. Il laboratorio 2 non ha effettuato la prova con il tossico cieco.

Su 70 laboratori, cinque (cod. n° 2, 3, 4, 31 e 39) hanno eseguito i test sia con organismi di allevamento che derivanti da forme criptobiotiche.

Tutti i laboratori partecipanti hanno ottenuto una percentuale di organismi immobili nel controllo $\leq 10\%$ in tutte le prove effettuate.

5.5.1 Risultati dei L_{KIT}

L_{KIT} – concentrazioni nominali del tossico di riferimento

Del gruppo solo 40 laboratori hanno effettuato la prova con il tossico di riferimento utilizzando concentrazioni nominali. Per le valutazioni statistiche sono stati utilizzati i risultati di tutti i laboratori. In figura 5.1 sono riportati i valori dell' EC_{50} -24 ore (h). Il valore di consenso dell' EC_{50} -24 h, determinato utilizzando la statistica robusta (algoritmo A), è risultato pari a $1,20 \pm 0,05$ mg/L. Lo scarto tipo della prova è pari a 0,3 mg/L.

Nelle figure 5.2 e 5.3 sono riportati i risultati della statistica h e k , rispettivamente. La figura 5.2 mostra la presenza di 2 *straggler* (laboratori 13 e 25). La statistica k individua uno *straggler* (laboratorio 35).

I valori di Z-score ottenuti dai laboratori partecipanti sono riportati in figura 5.4 e in tabella 5.5.

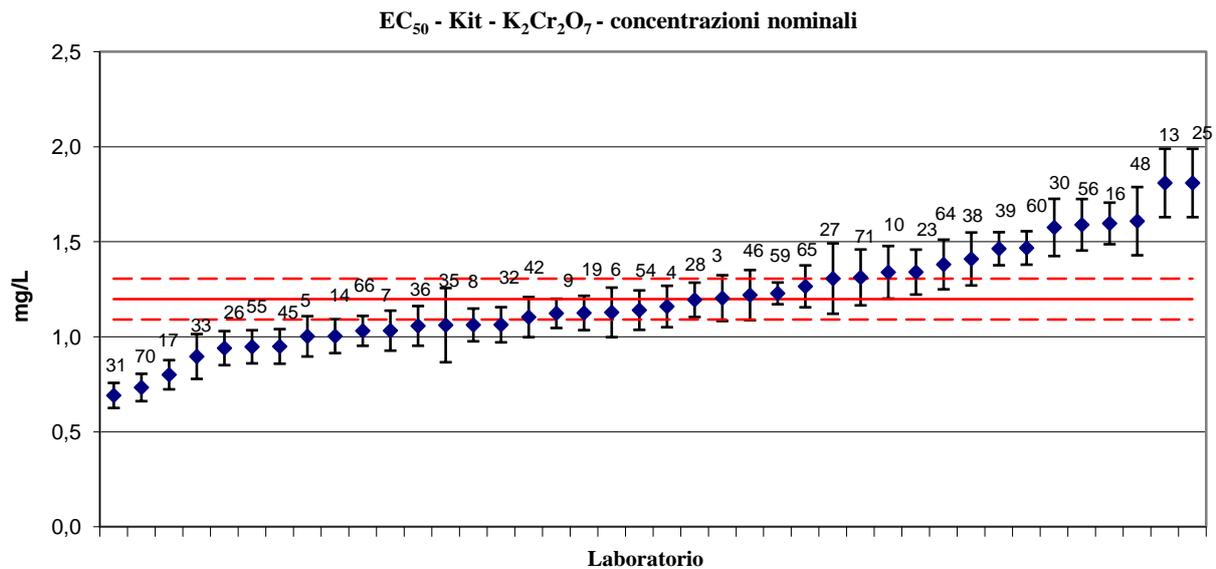


Figura 5.1- Valori di EC_{50-24h} (mg/L) per ciascun L_{KIT} . La barra d'incertezza associata a ciascun laboratorio corrisponde ad uno scarto tipo della media su 4 repliche. Le linee rosse, orizzontali, corrispondono al valore di consenso \pm l'incertezza associata calcolata utilizzando l'algoritmo A [ISO 13528].

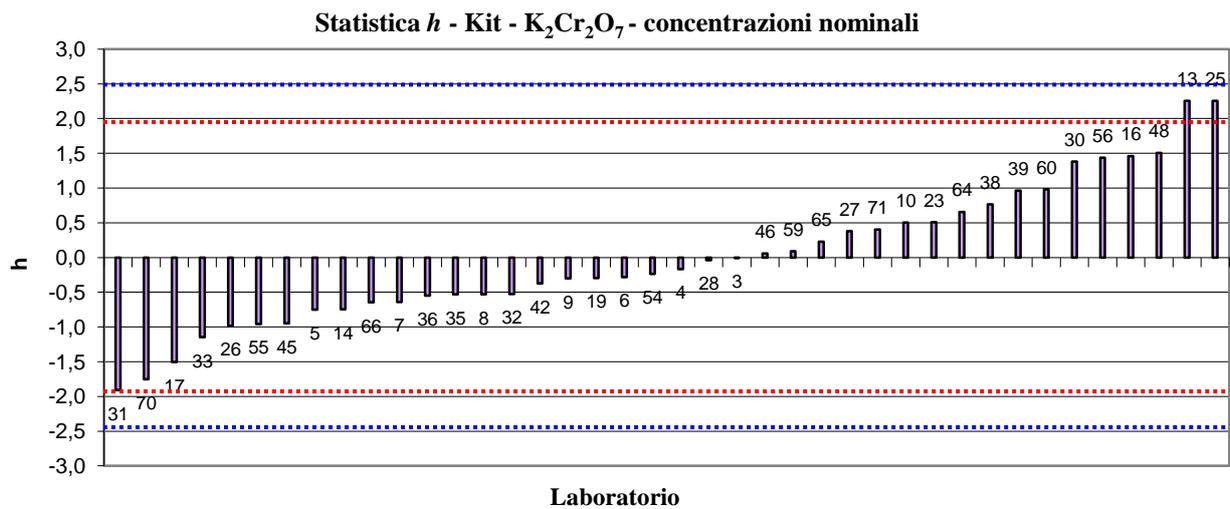


Figura 5.2 - Statistica h per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1%(blu) e al 5% (rosso)

Statistica k - Kit - $K_2Cr_2O_7$ - concentrazioni nominali

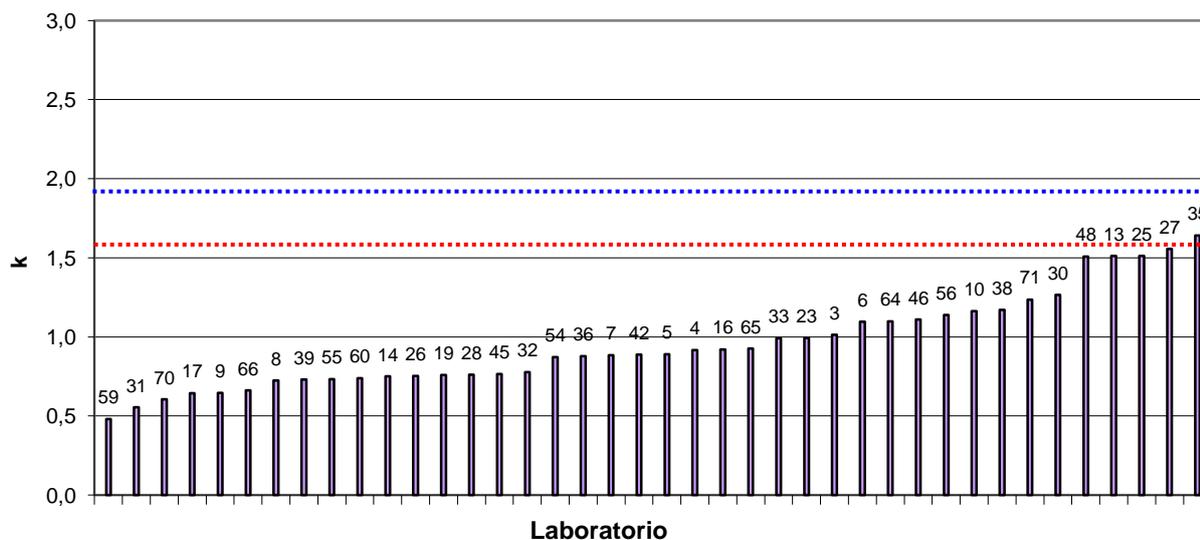


Figura 5.3- Statistica k per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1%(blu) e al 5% (rosso).

Z-score - Kit - $K_2Cr_2O_7$ - concentrazioni nominali

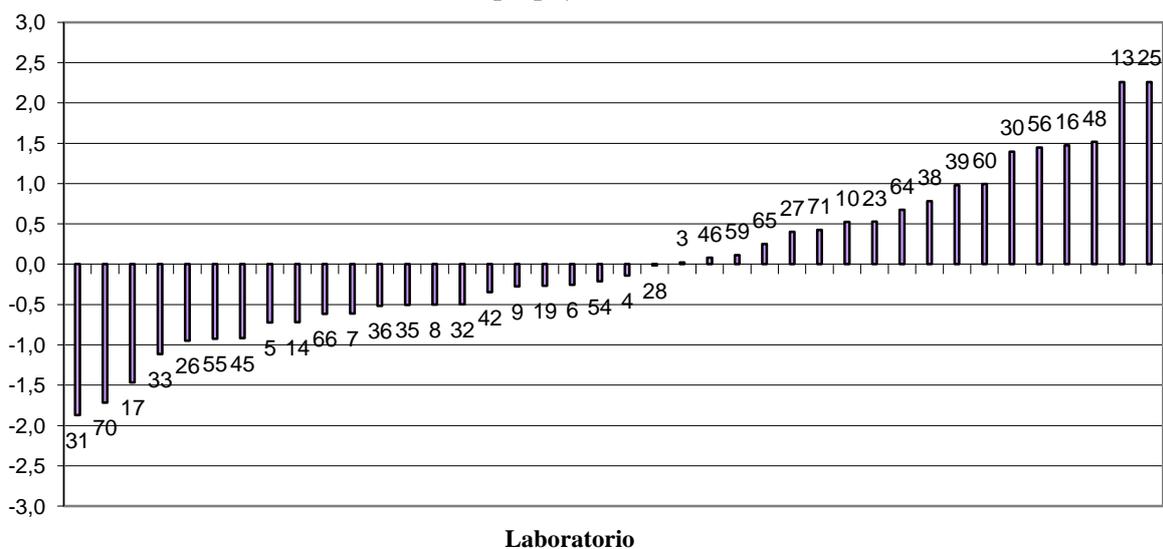


Figura 5.4- Valori di Z-score ottenuti dai L_{KIT} che hanno utilizzato i valori nominali per le concentrazioni del tossico di riferimento.

Tabella 5.5 - Valori di Z-score attribuiti ad ogni L_{KIT} utilizzando le concentrazioni nominali di $K_2Cr_2O_7$.

Laboratorio	Z-SCORE	Laboratorio	Z-SCORE
3	0,0	32	-0,5
4	-0,1	33	-1,1
5	-0,7	35	-0,5
6	-0,3	36	-0,5
7	-0,6	38	0,8
8	-0,5	39	1,0
9	-0,3	42	-0,3
10	0,5	45	-0,9
13	2,3	46	0,1
14	-0,7	48	1,5
16	1,5	54	-0,2
17	-1,5	55	-0,9
19	-0,3	56	1,4
23	0,5	59	0,1
25	2,3	60	1,0
26	-1,0	64	0,7
27	0,4	65	0,2
28	0,0	66	-0,6
30	1,4	70	-1,7
31	-1,9	71	0,4

L_{KIT} – concentrazioni misurate del tossico di riferimento

Sedici dei 40 laboratori, che hanno effettuato la prova con forme criptobiotiche, hanno determinato sperimentalmente le concentrazioni di dicromato di potassio utilizzate e hanno restituito i risultati (Allegato 3A). Per le valutazioni statistiche sono stati utilizzati i risultati di tutti e 16 i laboratori. In figura 5.5 sono riportati i valori dell'EC₅₀-24 h. Il valore di consenso dell'EC₅₀-24 h, determinato utilizzando la statistica robusta (algoritmo A) sui dati di tutti i laboratori che hanno effettuato la prova, è risultato pari a 1,29 ± 0,09 mg/L. Lo scarto tipo dalla prova è pari a 0,28 mg/L.

Nelle Figure 5.6 e 5.7 sono riportati i risultati della statistica *h* e *i* della statistica *k*, rispettivamente. In Figura 5.8 ed in Tabella 5.6 sono riportati i valori di Z-score ottenuti dai laboratori partecipanti alla prova valutativa.

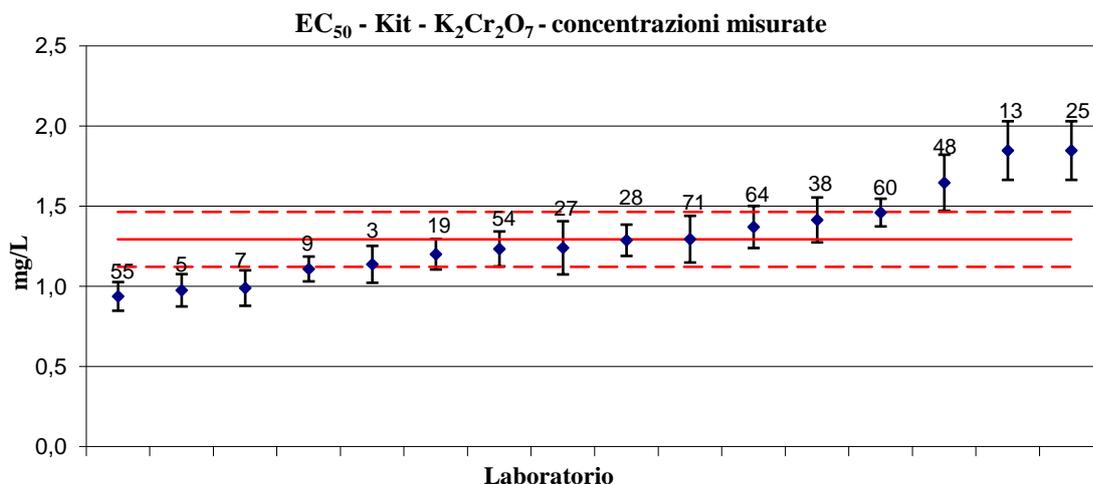


Figura 5.5- Valori di EC₅₀-24 h (mg/L) per ciascun L_{KIT} . La barra di incertezza associata a ciascun laboratorio corrisponde ad uno scarto tipo della media su 4 repliche. Le linee rosse orizzontali corrispondono al valore di consenso ± l'incertezza associata (ISO 13528).

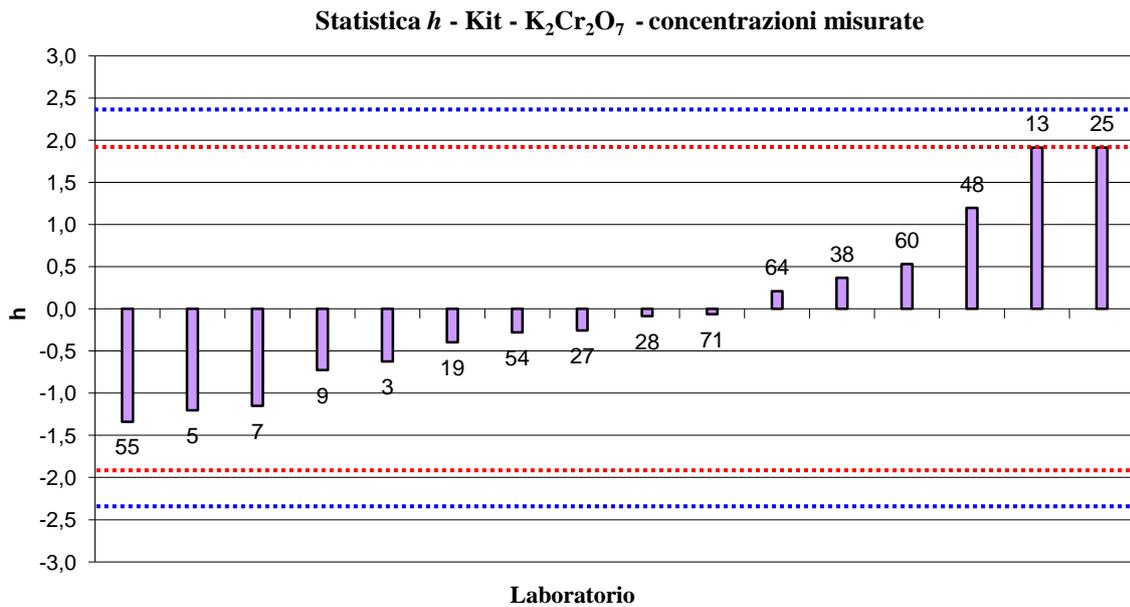


Figura 5.6 – Statistica h per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1%(blu) e al 5% (rosso)

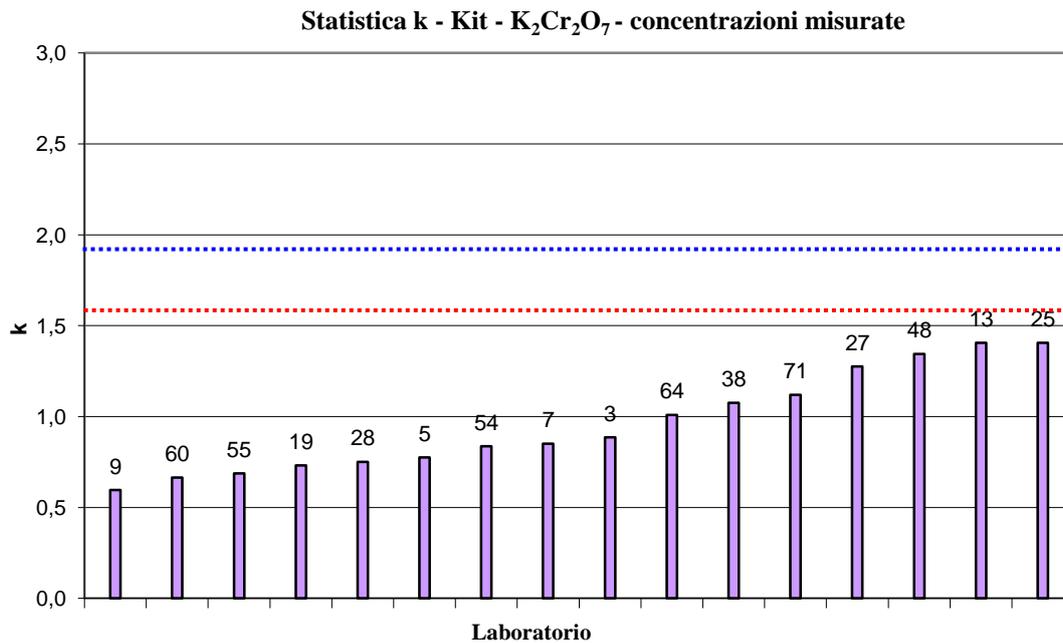


Figura 5.7 – Statistica k per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1%(blu) e al 5% (rosso).

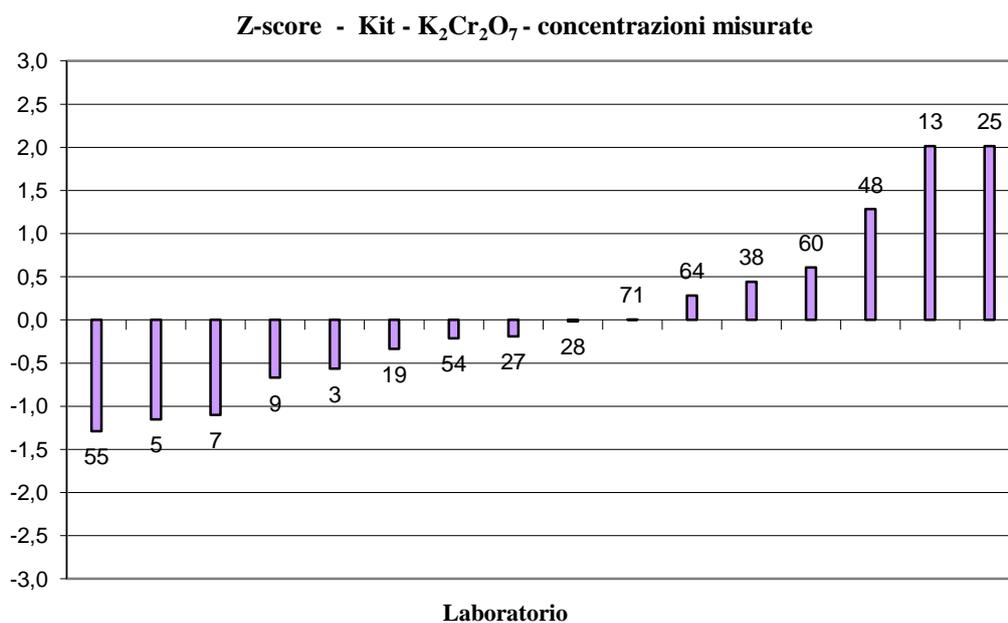


Figura 5.8 - Valori di Z-score ottenuti dai L_{KIT} che hanno utilizzato valori misurati per le concentrazioni del tossico di riferimento.

Tabella 5.6 - Valori di Z-score attribuiti ad ogni L_{KIT} utilizzando concentrazioni misurate di dicromato di potassio.

Laboratorio	Z-SCORE	Laboratorio	Z-SCORE
3	-0,6	28	0,0
5	-1,2	38	0,4
7	-1,1	48	1,3
9	-0,7	54	-0,2
13	2,0	55	-1,3
19	-0,3	60	0,6
25	2,0	64	0,3
27	-0,2	71	0,0

L_{KIT} – tossico cieco, cloruro di potassio

Del gruppo L_{KIT} 40 laboratori hanno restituito i risultati relativi alla prova con il tossico cieco, KCl, utilizzando concentrazioni nominali della sostanza. Per le valutazioni statistiche sono stati utilizzati i risultati di tutti i laboratori. In figura 5.9 sono riportati i valori dell'EC₅₀-24 h. Il valore di consenso dell' EC₅₀- 24 h, determinato utilizzando la statistica robusta (algoritmo A) sui dati di tutti i laboratori che hanno effettuato questa prova, è risultato pari a $0,78 \pm 0,03$ g/L. Lo scarto tipo della prova è pari a 0,14 g/L.

Nelle figure 5.10 e 5.11 sono riportati i risultati della statistica *h* e della statistica *k*, rispettivamente. La figura 5.10 mostra, per la statistica *h*, la presenza di uno *straggler* (laboratorio 16) e di un *outlier* (laboratorio 70). La statistica *k*, in figura 5.11, mostra un *outlier* (laboratorio 35) e uno *straggler* (laboratorio 7). In figura 5.12 ed in tabella 5.7 sono riportati i valori di Z-score ottenuti dai laboratori partecipanti al CI.

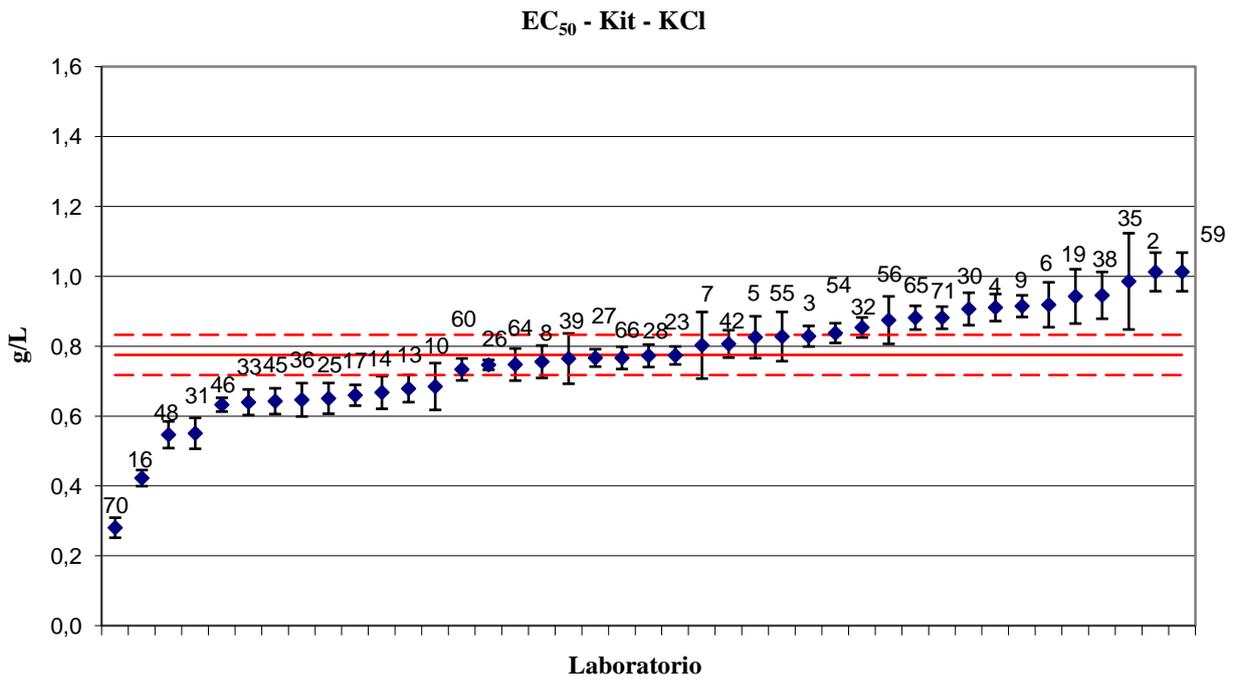


Figura 5.9- Valori di EC_{50-24 h} (g/L) per ciascun L_{KIT}. La barra di incertezza associata a ciascun laboratorio corrisponde ad uno scarto tipo della media su 4 repliche. Le linee rosse orizzontali corrispondono al valore di consenso \pm l'incertezza associata calcolato utilizzando l'algoritmo A (ISO 13528).

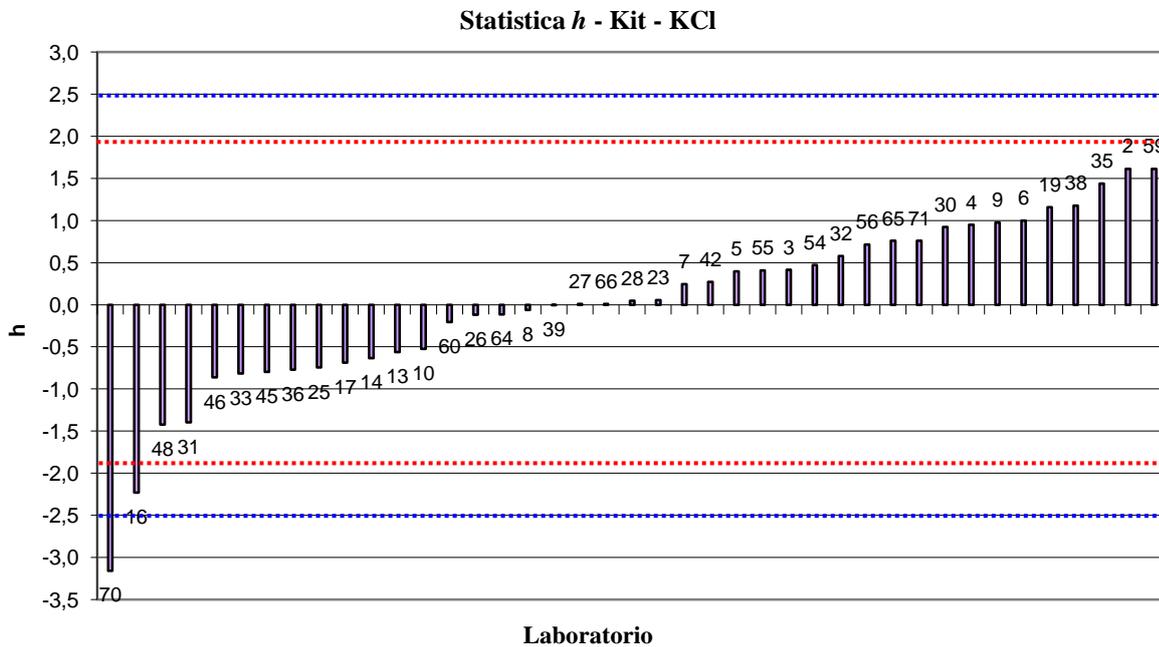


Figura 5.10 - Statistica *h* per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1% (blu) e al 5% (rosso)

Statistica k - Kit - KCl

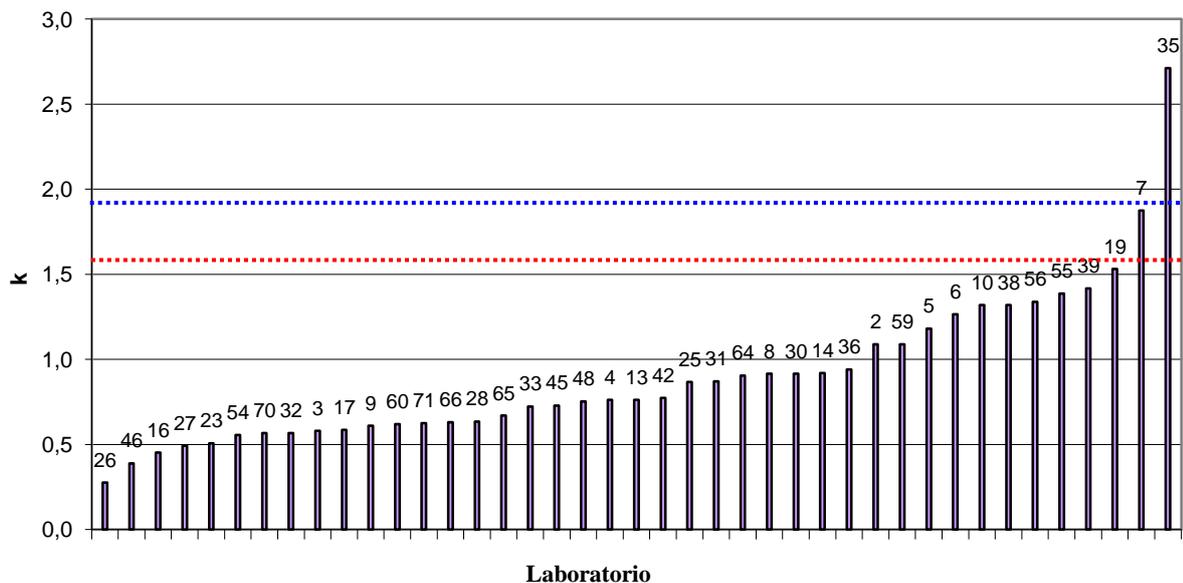


Figura 5.11- Statistica k per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1%(blu) e al 5% (rosso).

Z-score - Kit - KCl

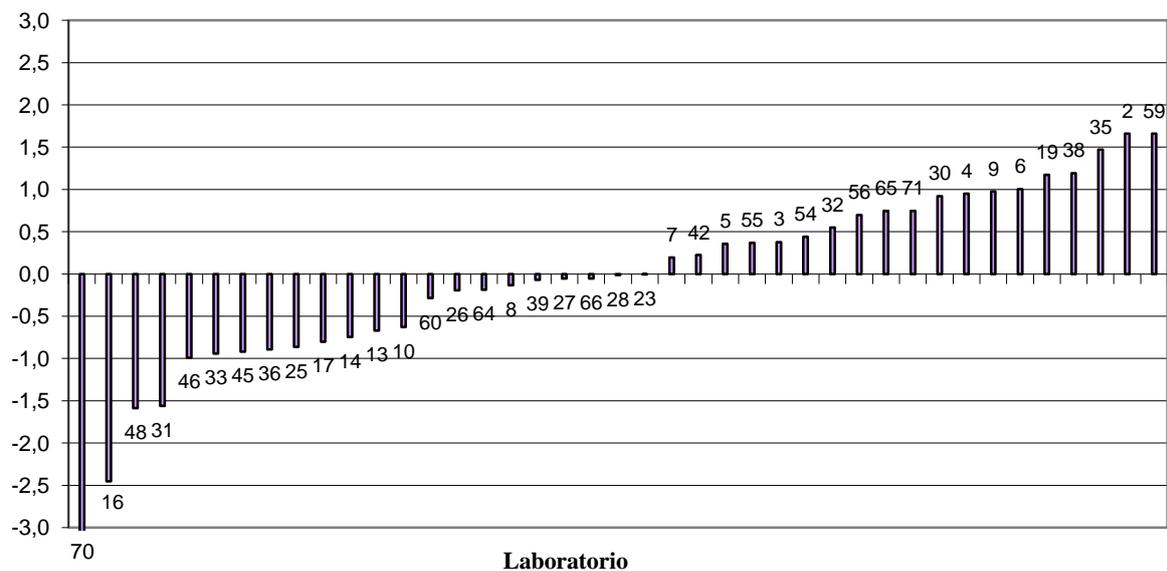


Figura 5.12 - Valori di Z-score ottenuti dai L_{KIT} nella prova con tossico cieco, KCl (concentrazioni nominali)

Tabella 5.7 - Valori di Z-score attribuiti ad ogni L_{KIT} , utilizzando concentrazioni nominali di cloruro di potassio.

Laboratorio	Z-SCORE	Laboratorio	Z-SCORE
2	1,6	32	0,5
3	0,3	33	-1,0
4	0,9	35	1,4
5	0,3	36	-0,9
6	1,0	38	1,2
7	0,2	39	-0,1
8	-0,2	42	0,2
9	0,9	45	-0,9
10	-0,7	46	-1,0
13	-0,7	48	-1,6
14	-0,8	54	0,4
16	-2,5	55	0,3
17	-0,8	56	0,7
19	1,1	59	1,6
23	0	60	-0,3
25	-0,9	64	-0,2
26	-0,2	65	0,7
27	-0,1	66	-0,1
28	0	70	-3,5
30	0,9	71	0,7
31	-1,6	-	-

5.5.2 Risultati dei L_{AL}

L_{AL} – concentrazioni nominali del tossico di riferimento, dicromato di potassio

Trentaquattro laboratori L_{AL} hanno restituito i risultati della prova con il tossico di riferimento $K_2Cr_2O_7$ utilizzando concentrazioni nominali (Allegato 3B). Per le valutazioni statistiche sono stati utilizzati i risultati di 33 laboratori perché il laboratorio n° 31 non è risultato conforme avendo presentato i dati di tossicità su due sole repliche.

In figura 5.13 sono riportati i valori dell' EC_{50-24} h dei 33 laboratori considerati. Lo scarto tipo dalla prova è pari a 0,35 mg/L.

Nelle figure 5.14 e 5.15 sono riportati i risultati della statistica h e della statistica k , rispettivamente. In figura 5.16 ed in tabella 5.8 sono riportati i valori di Z-score ottenuti dai laboratori partecipanti alla prova valutativa interlaboratorio.

EC₅₀ - Allevamento - K₂Cr₂O₇ - concentrazioni nominali

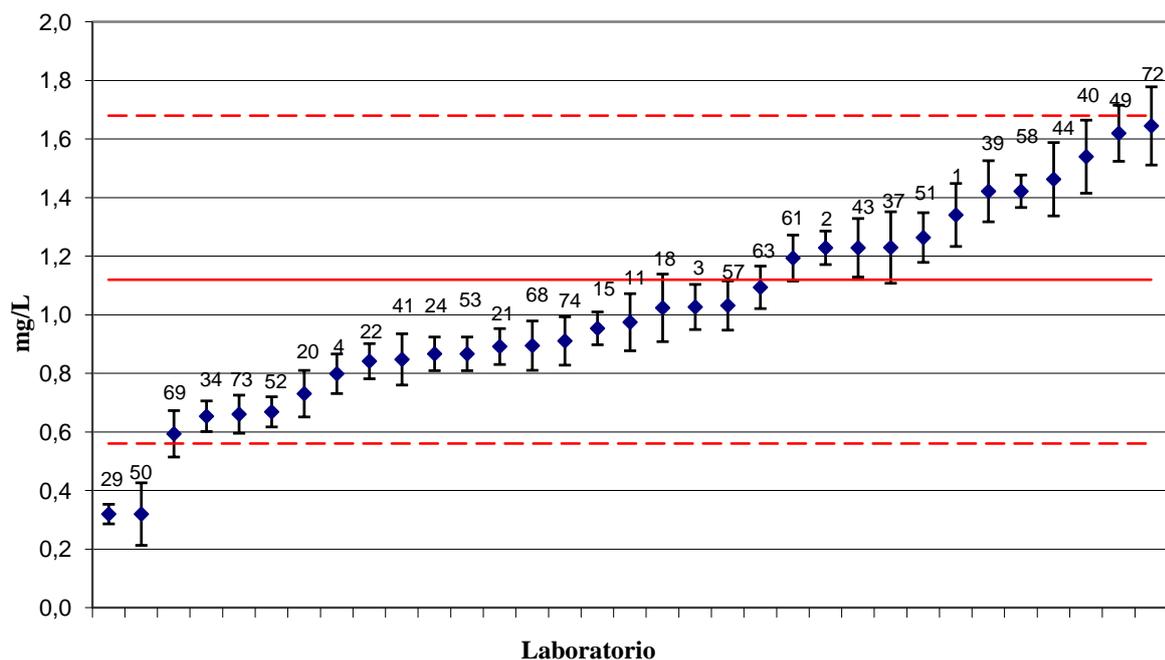


Figura 5.13 - Valori di EC₅₀-24 h (mg/L) per ciascun L_{AL}. La barra di incertezza associata a ciascun laboratorio corrisponde ad uno scarto tipo della media su 4 repliche. Le linee rosse orizzontali corrispondono al valore di consenso ± l'incertezza come riportato sulla ISO 6341.

Statistica h - Allevamento - K₂Cr₂O₇ - concentrazioni nominali

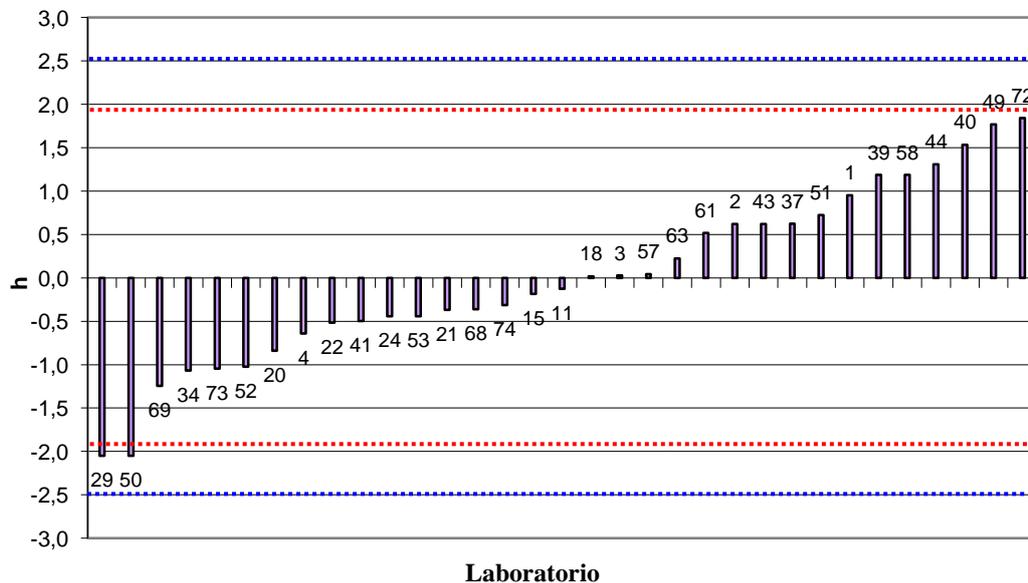


Figura 5.14 - Statistica h per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1% (blu) e al 5% (rosso).

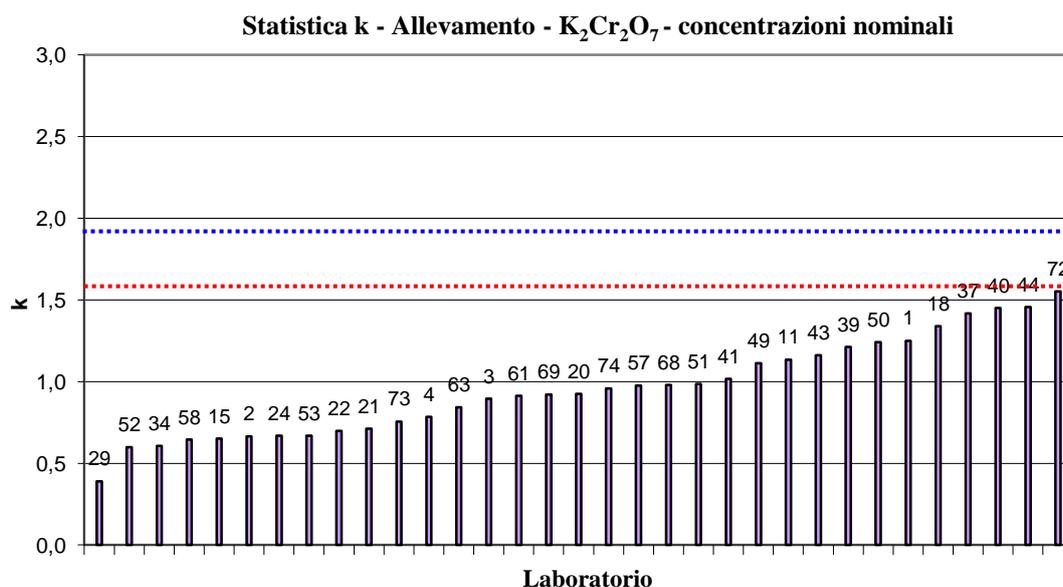


Figura 5.15 - Statistica k per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1% (blu) e al 5% (rosso).

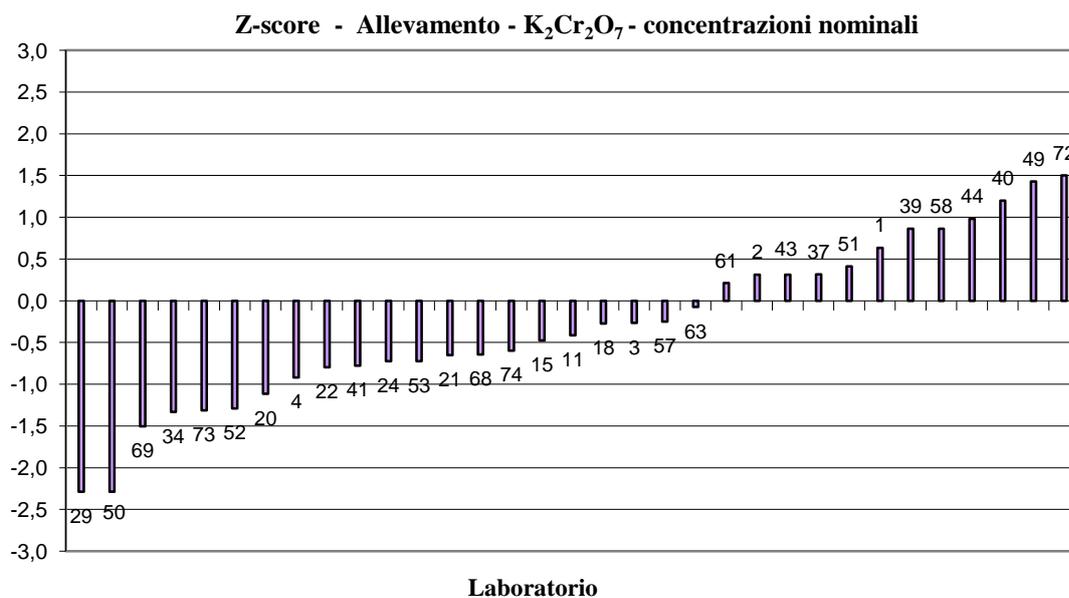


Figura 5.16 - Valori di Z-score attribuiti ai L_{AL} nella prova con dicromato di potassio (concentrazioni nominali)

Tabella 5.8 - Valori di Z-score attribuiti ad ogni L_{AL} nella prova con dicromato di potassio (concentrazioni nominali)

Laboratorio	Z-SCORE	Laboratorio	Z-SCORE
1	0,6	41	-0,8
2	0,3	43	0,3
3	-0,3	44	1,0
4	-0,9	49	1,4
11	-0,4	50	-2,3
15	-0,5	51	0,4
18	-0,3	52	-1,3
20	-1,1	53	-0,7
21	-0,7	57	-0,3
22	-0,8	58	0,9
24	-0,7	61	0,2
29	-2,3	63	-0,1
34	-1,3	68	-0,6
37	0,3	69	-1,5
39	0,9	72	1,5
40	1,2	73	-1,3

L_{AL} – Concentrazioni misurate del tossico di riferimento, dicromato di potassio

Diciassette laboratori hanno misurato le concentrazioni del tossico di riferimento e hanno restituito i risultati (Allegato 5B). Per le valutazioni statistiche sono stati utilizzati i risultati di 16 laboratori perché il laboratorio n° 31 non è risultato conforme avendo presentato i dati di tossicità su due sole repliche. In figura 5.17 sono riportati i valori dell'EC₅₀-24 h dei 16 laboratori considerati. Lo scarto tipo della prova, valutato con la statistica robusta, è risultato pari a 0,19 mg/L.

Nelle figure 5.18 e 5.19 sono riportati i risultati della statistica *h* e della statistica *k*, rispettivamente. In figura 5.20 e in tabella 5.9 sono riportati i valori di Z-score ottenuti.

EC₅₀ - Allevamento - K₂Cr₂O₇ - concentrazioni misurate

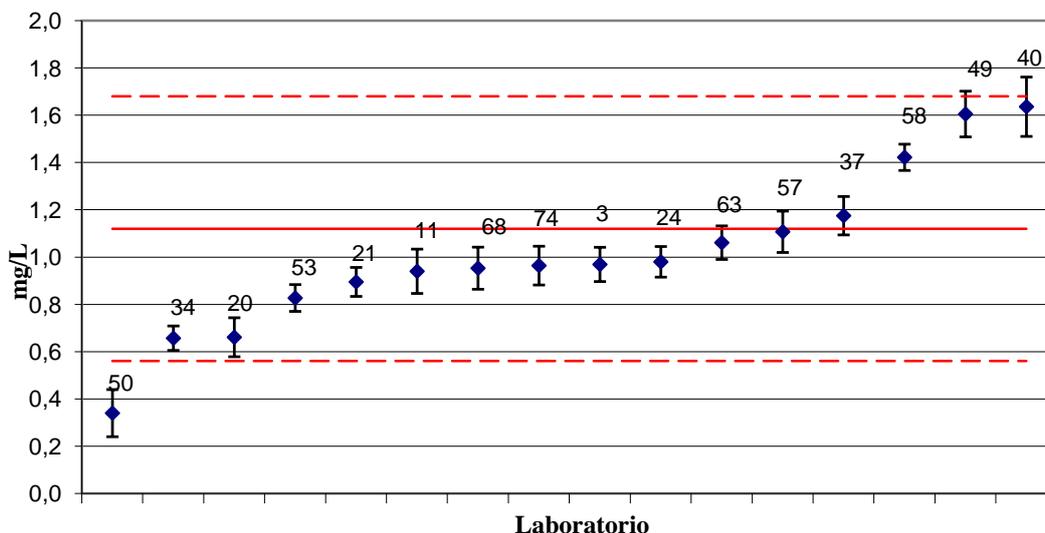


Figura 5.17 - Valori di EC₅₀-24 h (mg/L) per ciascun L_{AL} . la barra di incertezza associata corrisponde ad uno scarto tipo della media su 4 repliche. Le linee rosse orizzontali corrispondono al valore di consenso \pm l'incertezza (ISO 6341).

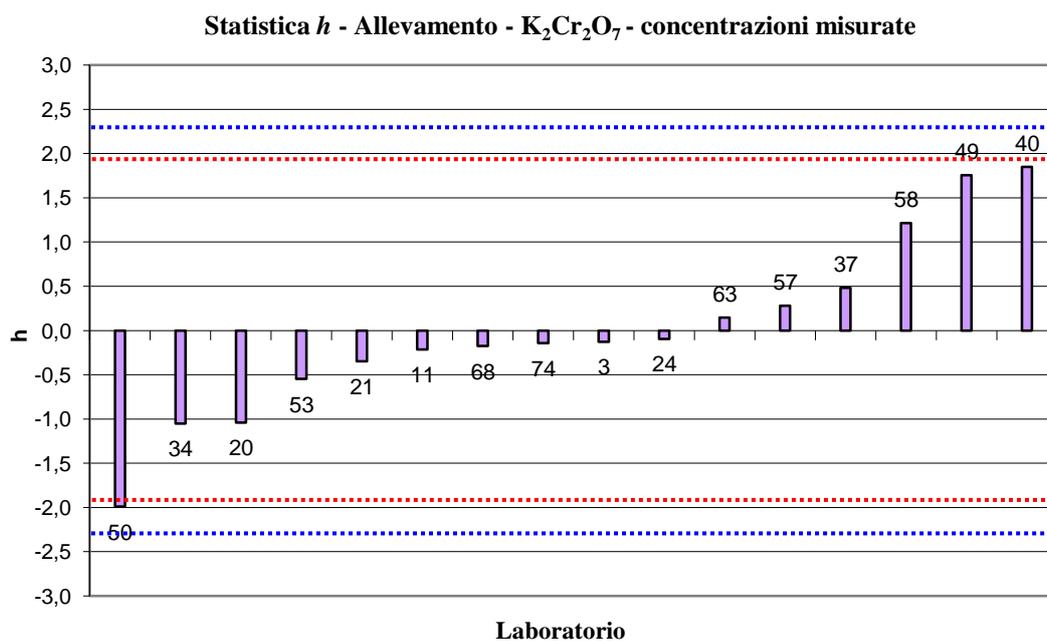


Figura 5.18 - Statistica h per i diversi L_{AL} . Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1%(blu) e al 5% (rosso).

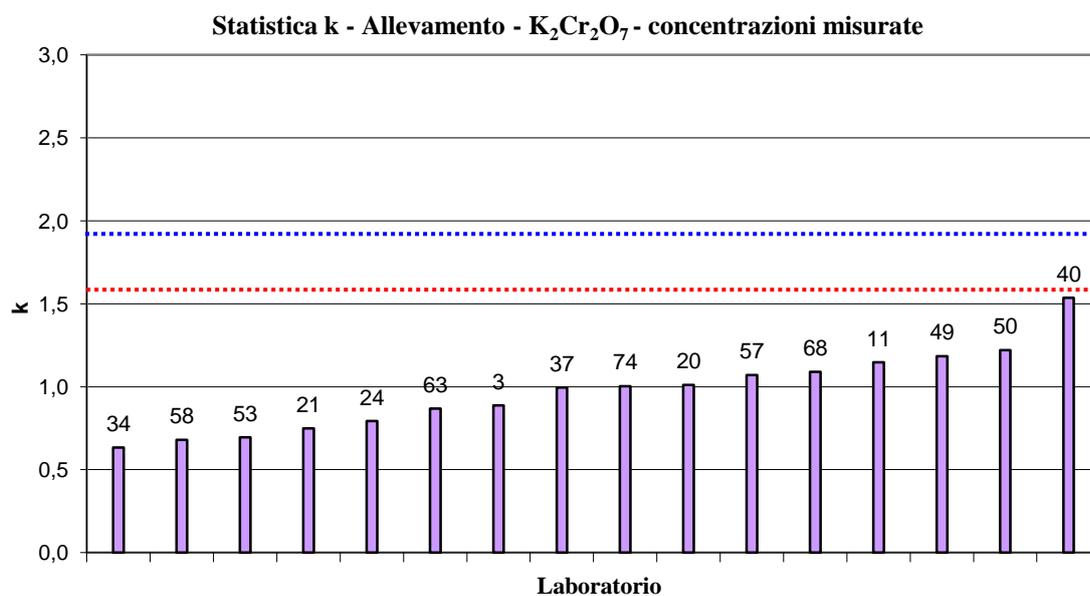


Figura 5.19 - Statistica k per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1%(blu) e al 5% (rosso).

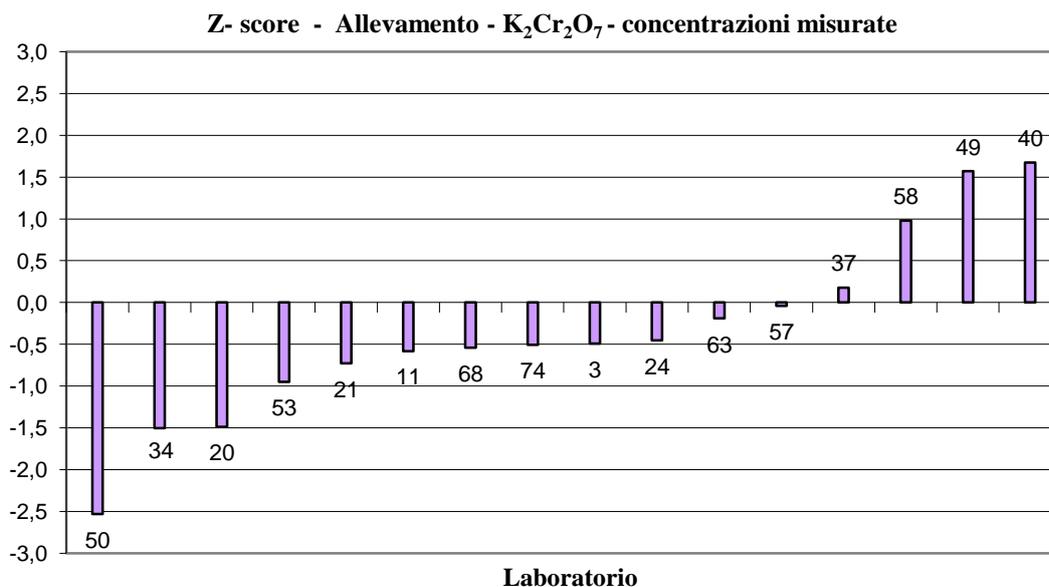


Figura 5.20 Valori di Z-score ottenuti dai L_{AL} nella prova con dicromato di potassio (concentrazioni misurate)

Tabella 5.9 -Valori di Z-score attribuiti ad ogni L_{AL} nella prova con dicromato potassio (concentrazioni misurate)

Laboratorio	Z-SCORE	Laboratorio	Z-SCORE
3	-0,5	49	1,6
11	-0,6	50	-2,5
20	-1,5	53	-1,0
21	-0,7	57	0,0
24	-0,5	58	1,0
34	-1,5	63	-0,2
37	0,2	68	-0,5
40	1,7	74	-0,5

L_{AL} – Concentrazioni nominali del tossico cieco, cloruro di potassio

Trentatré laboratori hanno restituito i risultati relativi alla prova con il tossico cieco, KCl utilizzando le concentrazioni nominali (Allegato 5D). Per le valutazioni statistiche sono stati utilizzati i risultati di 32 laboratori perché il laboratorio n° 31 non è risultato conforme avendo presentato i dati di tossicità su due sole repliche. In figura 5.21 sono riportati i valori di EC₅₀-24 h dei 32 laboratori considerati. Il valore di consenso dell' EC₅₀-24 h, determinato utilizzando la statistica robusta (algoritmo A) sui dati di tutti i laboratori che hanno effettuato questa prova è risultato pari a 0,81±0,09 g/L. Lo scarto tipo per questa prova è pari a 0,39 g/L.

Nelle figure 5.22 e 5.23 sono riportati i risultati della statistica *h* e della statistica *k*, rispettivamente. La figura 5.23 evidenzia per la statistica *k* 2 outlier (laboratori 20 e 39). In figura 5.24 e in tabella 5.10 sono riportati i valori di Z-score ottenuti dai laboratori L_{AL}.

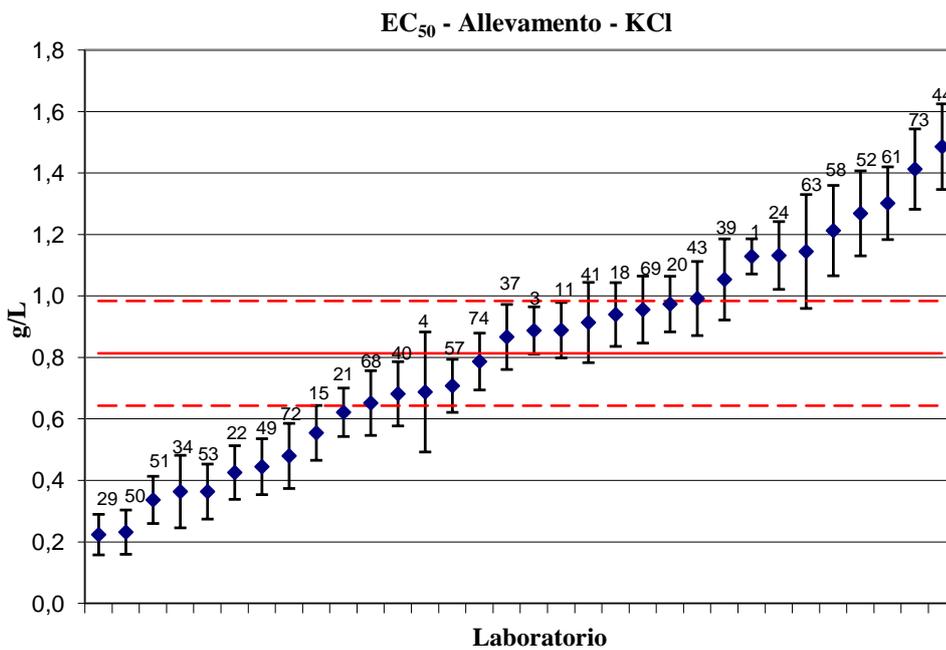


Figura - 5.21 Valori di $EC_{50-24\text{ h}}$ (g/L) per ciascun L_{AL} . La barra di incertezza associata a ciascun laboratorio corrisponde ad uno scarto tipo della media su 4 repliche. Le linee rosse orizzontali corrispondono al valore di consenso \pm l'incertezza associata calcolati utilizzando l'algoritmo A (ISO 13528).

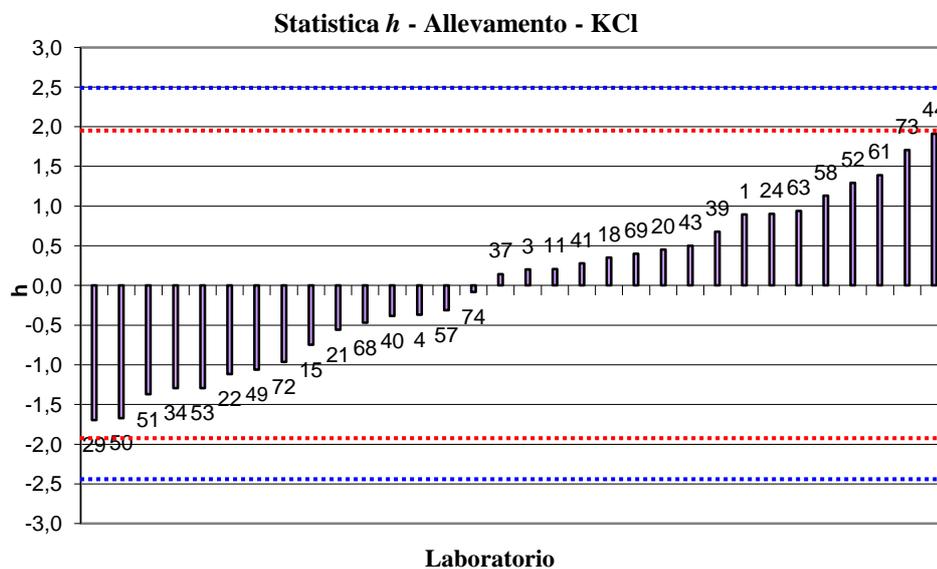


Figura 5.22 - Statistica h per i diversi laboratori. Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1% (blu) e al 5% (rosso).

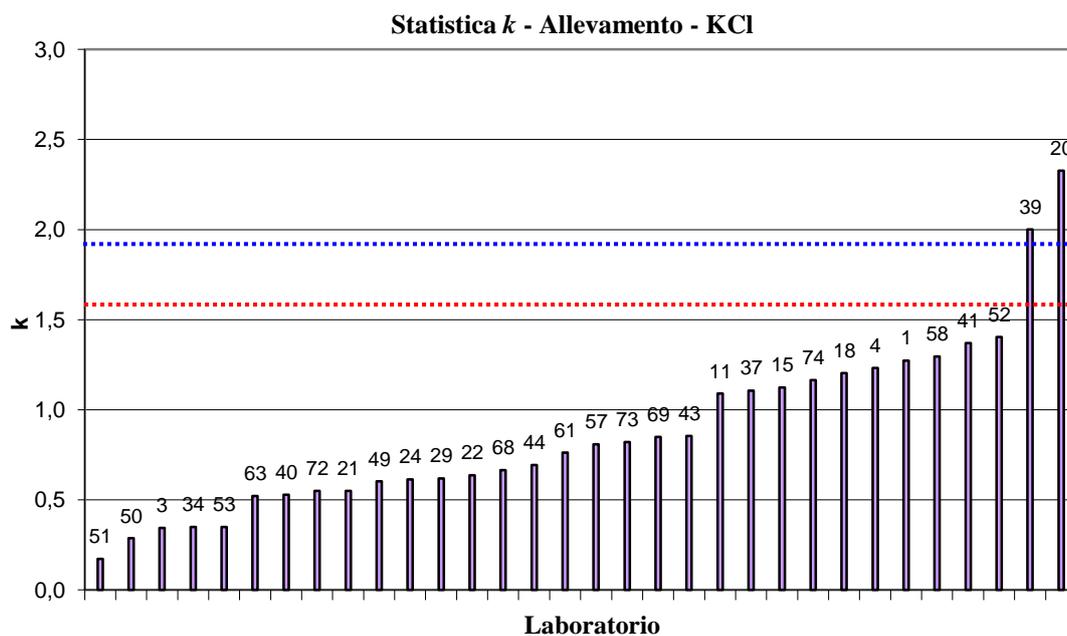


Figura 5.23 - Statistica k per i diversi L_{AL} . Le linee orizzontali rappresentano i livelli di significatività all'1% (blu) e al 5% (rosso).

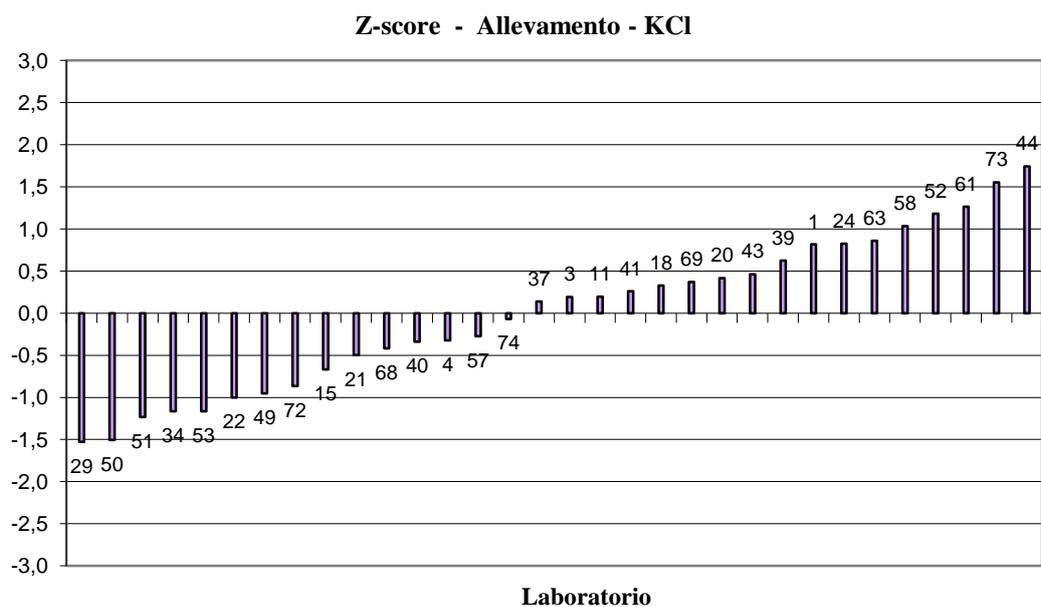


Figura 5.24 - Valori di Z-score ottenuti dai L_{AL} con il tossico cieco, cloruro di potassio.

Tabella 5.10- Valori di Z-score attribuiti ad ogni L_{AL} con il tossico cieco, cloruro di potassio

Laboratorio	Z-SCORE	Laboratorio	Z-SCORE
1	0,8	43	0,5
3	0,2	44	1,7
4	-0,3	49	-1,0
11	0,2	50	-1,5
15	-0,7	51	-1,2
18	0,3	52	1,2
20	0,4	53	-1,2
21	-0,5	57	-0,3
22	-1,0	58	1,0
24	0,8	61	1,3
29	-1,5	63	0,9
34	-1,2	68	-0,4
37	0,1	69	0,4
39	0,6	72	-0,9
40	-0,3	73	1,6
41	0,3	74	-0,1

5.5.3 Confronto dei risultati ottenuti nelle prove con tossico cieco e tossico di riferimento per il kit e l'allevamento

Nelle figure 5.25 e 5.26 sono riportati i grafici di Youden per le prove effettuate con gli organismi provenienti da forme criptobiotiche e di allevamento, rispettivamente. Ogni laboratorio è identificato da una coppia di coordinate rappresentate dai valori medi dell' EC_{50-24} h ottenuti con il tossico cieco, cloruro di potassio e il tossico di riferimento, dicromato di potassio. Il piano è diviso in quattro quadranti dai valori medi di EC_{50} ottenuti con i due diversi sali.

Le informazioni che i laboratori possono trarre da questi grafici sono di carattere qualitativo. La variabilità dei dati dei laboratori che si trovano in prossimità dell'intersezione degli assi è dovuta ad effetti casuali, mentre la variabilità dei dati dei laboratori che si trovano nel IV e II quadrante lontano dall'intersezione degli assi è dovuta ad effetti sistematici. I laboratori che si trovano nel secondo quadrante lontano dall'intersezione degli assi sovrastimano sistematicamente, mentre i laboratori che si trovano nel quarto quadrante lontano dall'intersezione degli assi sottostimano sistematicamente.

Come evidenziato nella figura 5.21, nel caso dell'allevamento, i valori di EC_{50-24} h sono molto più dispersi. Questo andamento è probabilmente da attribuire all'utilizzo da parte dei partecipanti di organismi di origine diversa e di metodiche differenti per l'esecuzione della prova.

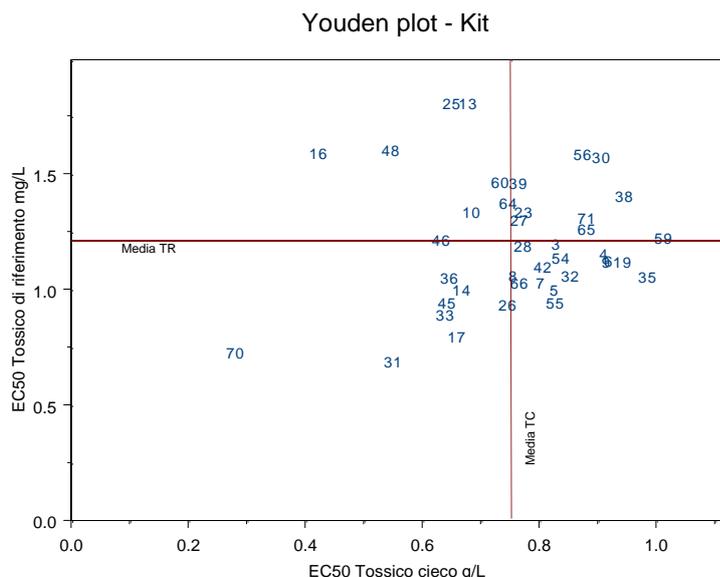
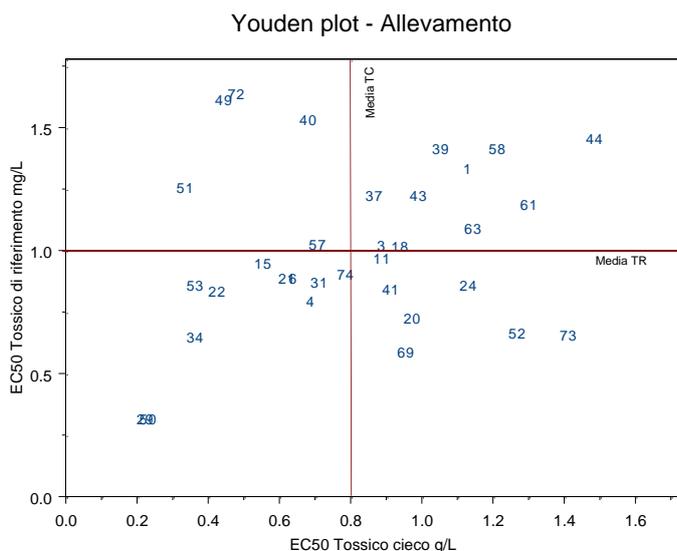


Figura 5.25 - Youden plot per le 2 prove effettuate con organismi provenienti da forme criptobiotiche. Gli assi rappresentano i valori medi per il tossico cieco, cloruro di potassio (TC) e per il tossico di riferimento, dicromato di potassio (TR).



8

Figura 5.26 - Youden plot per le 2 prove effettuate con organismi provenienti da allevamento. Gli assi rappresentano i valori medi per il tossico cieco (TC), cloruro di potassio (TC) e per il tossico di riferimento, dicromato di potassio (TR).

5.5.4 Scarto tipo di ripetibilità e scarto tipo di riproducibilità dei metodi utilizzati nel circuito Nella Tabella 5.11 sono riportati i valori medi di $EC_{50-24h} \pm$ lo scarto tipo (ST) della prova, calcolati sulla base delle due diverse tipologie di organismi e delle differenti metodologie utilizzate dai laboratori partecipanti.

La Tabella 5.12 riporta lo scarto tipo di ripetibilità e lo scarto tipo di riproducibilità valutati per ogni prova effettuata dai laboratori e per le due diverse tipologie di organismi e di metodologie applicate.

I valori dello scarto tipo di riproducibilità non possono essere direttamente utilizzati dai laboratori per la valutazione dell'incertezza analitica, in quanto non tutti i partecipanti hanno inviato tutte le informazioni

diverse procedure analitiche utilizzate. Inoltre, per il metodo ISO 6341, il numero di laboratori (8) è troppo esiguo per generalizzare i dati di precisione ottenuti.

In conclusione, i valori dello scarto tipo di riproducibilità ottenuti nella prova valutativa APAT IC006 danno solo una indicazione circa la variabilità del test di tossicità acuta (24 h) con *Daphnia magna* sul territorio nazionale.

I risultati tuttavia potranno essere utilizzati dai laboratori che hanno ottenuto un valore di z-score inferiore a 2 per confrontare l'incertezza estesa calcolata per altre vie con quella ottenuta considerando un'incertezza estesa uguale a 2 volte lo scarto tipo di riproducibilità ottenuto nel presente esercizio interlaboratorio.

Tabella 5.11 - Media aritmetica e scarto tipo dei valori di $EC_{50-24 h}$ ottenuti nelle prove realizzate con organismi di diversa origine e con metodologie differenti.

Tipo di prova	N. Laboratori	Metodo di prova	$EC_{50-24 h}$ ± ST della prova
$L_{KIT} - K_2Cr_2O_7 - c.n.$	40	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	1,20 ± 0,28 mg/L
$L_{KIT} - K_2Cr_2O_7 - c.m.$	16	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	1,29 ± 0,28 mg/L
$L_{AL} - K_2Cr_2O_7 - c.n.$	33	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	1,02 ± 0,35 mg/L
$L_{AL} - K_2Cr_2O_7 - c.m.$	16	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	1,01 ± 0,19 mg/L
$L_{AL} - K_2Cr_2O_7 - c.n.$	8	ISO 6341	1,13 ± 0,29 mg/L
$L_{AL} - K_2Cr_2O_7 - c.n.$	14	APAT-IRSA	0,90 ± 0,25 mg/L
$L_{KIT} - KCl - c.n.$	40	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	0,78 ± 0,14 g/L
$L_{AL} - KCl - c.n.$	32 ^b	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	0,81 ± 0,39 g/L
$L_{AL} - KCl - c.n.$	8	ISO 6341	0,82 ± 0,34 g/L
$L_{AL} - KCl - c.n.$	14	APAT-IRSA	0,81 ± 0,32 g/L

Abbreviazioni: c.n.: concentrazioni nominali; c.m.: concentrazioni misurate.

Note: ^a protocollo fornito dagli organizzatori; ^b 11 laboratori non hanno fornito informazioni circa il metodo di prova utilizzato

Tabella 5.12 – Interconfronto APAT IC006 - Scarto tipo di ripetibilità e scarto tipo di riproducibilità per le diverse metodologie applicate dai laboratori. Tra parentesi è riportato il numero dei laboratori.

Tipo di prova	Metodo di prova	$EC_{50-24 h}$	Scarto tipo di ripetibilità (CV%)	Scarto tipo di riproducibilità (CV%)
$L_{KIT} - K_2Cr_2O_7 - c.n.$	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	1,20 mg/l (40)	0,1 mg/L (10)	0,3 mg/L (24)
$L_{KIT} - K_2Cr_2O_7 - c.m.$	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	1,31 mg/l (16)	0,1 mg/L (10)	0,3 mg/L (24)
$L_{AL} - K_2Cr_2O_7 - c.n.$	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	1,02 mg/L (33)	0,09 mg/L (8)	0,35 mg/L (34)
$L_{AL} - K_2Cr_2O_7 - c.m.$	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	1,01 mg/l (16)	0,08 mg/L (8)	0,34 mg/L (34)
$L_{AL} - K_2Cr_2O_7 - c.n.$	ISO 6341	1,13 mg/l (8)	0,10 mg/L (9)	0,31 mg/L (27)
$L_{AL} - K_2Cr_2O_7 - c.n.$	APAT-IRSA	0,90 mg/l (14)	0,08 mg/L (9)	0,26 mg/L (29)
$L_{KIT} - KCl - c.n.$	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	0,76 g/L (41)	0,05 g/L (7)	0,16 g/L (21)
$L_{AL} - KCl - c.n.$	Protocollo II IC Nazionale (2003) ^a	0,82 g/L (32)	0,04 g/L (5)	0,35 g/L (43)
$L_{AL} - KCl - c.n.$	ISO 6341	0,82 g/L (7)	0,04 g/L (5)	0,34 g/L (40)
$L_{AL} - KCl - c.n.$	APAT-IRSA	0,81 g/L (14)	0,04 g/L (5)	0,36 g/L (44)

Abbreviazioni: c.n.: concentrazioni nominali; c.m.: concentrazioni misurate.

Note: ^a protocollo fornito dagli organizzatori;

5.5.4 Confronto tra i valori medi di EC_{50-24 h} ottenuti con metodi diversi

Al fine di verificare se le differenze riscontrate tra i valori medi di EC_{50-24 h} ottenuti con i diversi metodi sono statisticamente significative è stato applicato il test t per medie di campioni tra loro indipendenti. I risultati del t test sono riportati nella Tabella 5.13.

Per quanto riguarda la prova con il tossico di riferimento, dicromato di potassio, si evidenzia quanto segue:

1. i valori medi di EC_{50-24 h} ottenuti con organismi di allevamento non sono risultate significativamente diversi tra loro, indipendentemente dal metodo utilizzato;
2. i valori medi di EC_{50-24 h} ottenuti da organismi di allevamento sono significativamente differenti da quelli ottenuti con forme criptobiotiche, indipendentemente dal metodo utilizzato per determinare la concentrazione del tossico di riferimento (nominale o misurata);
3. la suddivisione dei dati ottenuti da organismi di allevamento sulla base del metodo di prova porta ad una drastica riduzione del numero di laboratori su cui effettuare il confronto, anche perchè 11 laboratori non hanno fornito informazioni in merito al metodo;
4. per gli organismi di allevamento, i valori medi di EC_{50-24 h} ottenuti con il metodo EN ISO 6341:99 sono confrontabili a quelli ottenuti con il metodo APAT-IRSA;
5. i valori medi di EC_{50-24 h} ottenuti con il metodo EN ISO 6341:99 da organismi di allevamento (8 laboratori) non sono risultati statisticamente diversi da quelli ottenuti utilizzando forme criptobiotiche;
6. i valori medi di EC_{50-24 h} ottenuti con il metodo APAT-IRSA da organismi di allevamento (14 laboratori) sono risultati statisticamente diversi da quelli ottenuti utilizzando forme criptobiotiche.

Per quanto riguarda il tossico cieco i valori medi di EC_{50-24 h} non sono statisticamente diversi tra loro, indipendentemente dal metodo utilizzato e dalla provenienza degli organismi.

Il confronto tra i valori di EC_{50-24 h} ottenuti con metodi diversi non è generalizzabile, in quanto i protocolli sperimentali impiegati dai laboratori, che hanno utilizzato organismi di allevamento, sono stati liberamente scelti dai partecipanti, mentre il confronto tra metodi impone di utilizzare protocolli armonizzati tra tutti i partecipanti in modo da evitare fattori che possono mascherare e/o esaltare le differenze tra metodi. Questo risultato evidenzia ancora una volta l'importanza della dichiarazione del metodo e di una completa descrizione delle condizioni sperimentali da parte dei laboratori per ricavare dai risultati dei circuiti anche informazioni sui metodi utilizzati.

Tabella 5.13 - Risultati del t-test per campioni indipendenti

Confronto	Risultato del t - test
AL/KIT (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. nominali)	Significativo
AL/KIT (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. misurate)	Significativo
AL (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. nominali) /AL (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. misurate)	Non Significativo
KIT (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. nominali) / KIT (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. misurate)	Non Significativo
AL/KIT (KCl)	Non Significativo
AL (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. nominali) ISO6341 / AL (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. misurate) APAT-IRSA	Non Significativo
AL (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. nominali) ISO 6341 / KIT (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. nominali)	Non Significativo
AL (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. nominali) APAT-IRSA/ KIT (K ₂ Cr ₂ O ₇ conc. nominali)	Significativo
AL (KCl) ISO/AL (KCl) APAT-IRSA	Non Significativo

Abbreviazioni: AL: allevamento; conc.: concentrazioni; K₂Cr₂O₇: tossico di riferimento; KIT: forme criptobiotiche; KCl: tossico cieco

5.6 Conclusioni

La prova valutativa APAT-IC006 riguardante il saggio di tossicità acuta (24 h) con *Daphnia magna* è stato realizzato nell'ambito delle attività programmate del progetto "Circuiti di interconfronto per l'individuazione di un gruppo tecnico permanente regionale o multi regionale (GTP) per il monitoraggio continuo della qualità dei dati prodotti dai laboratori regionali che svolgono attività di controllo ambientale" avviato dall'APAT in collaborazione con ARPA-Veneto.

Il 90% dei laboratori che hanno aderito al circuito hanno inviato i risultati della prova. Dei 70 laboratori che hanno inviato i risultati, 40 laboratori hanno effettuato la prova con organismi provenienti da forme criptobiotiche (KIT), mentre 33 laboratori hanno effettuato la prova con organismi allevati (AL) all'interno del proprio laboratorio. Cinque laboratori hanno effettuato le prove con entrambe le tipologie di organismi.

Per quanto riguarda i risultati con il tossico di riferimento, dicromato di potassio, il 95% dei laboratori ha ottenuto uno z-score inferiore a 2 e nessun laboratorio ha ottenuto uno z-score maggiore di 3. Lo stesso risultato si ottiene utilizzando il metodo grafico della statistica *h*.

Anche con il tossico cieco, cloruro di potassio, il 95% dei laboratori che hanno utilizzato forme criptobiotiche ha ottenuto un valore di z-score inferiore a 2, per tutti i laboratori che hanno utilizzato organismi provenienti da allevamento hanno ottenuto un valore di z-score inferiore a 2. Questi risultati qualificano in modo positivo la rete dei laboratori presente sul territorio nazionale.

I valori dello scarto tipo di riproducibilità ottenuti in questo esercizio di interconfronto sono da ritenersi solo indicativi della variabilità del saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna* sul territorio nazionale, in quanto più del 30% dei laboratori che hanno utilizzato l'allevamento non ha dichiarato il metodo di prova e, in generale, le informazioni fornite sono insufficienti a valutare in modo completo le procedure sperimentali adottate dai laboratori.

Anche il confronto tra i valori medi di EC₅₀-24 h ottenuti con metodi diversi ha un valore indicativo che rimane all'interno di questo interconfronto.

In conclusione si ritiene opportuno proporre una nuova prova valutativa con procedure analitiche definite in modo da poter effettuare un confronto robusto tra le diverse modalità di esecuzione del saggio (allevamento e metodo ISO 6341, allevamento e metodo APAT/IRSA, forme criptobiotiche).

5.7 Riferimenti

- APAT-IRSA-CNR 2003 – Metodi analitici per le acque. APAT Manuali e Linee guida 29/2003 vol. 3°
- UNI EN ISO 6341:1999 – Qualità dell'acqua – Determinazione dell'inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Prova di tossicità acuta

5.8 Allegati

I risultati originali forniti dai laboratori partecipanti alla prova valutativa APAT IC006 sono riportati negli allegati:

- Allegato 5A Risultati dei L_{KIT} tossico di riferimento K₂Cr₂O₇ – concentrazioni nominali e misurate
- Allegato 5B Risultati dei L_{AL} tossico di riferimento K₂Cr₂O₇ – concentrazioni nominali e misurate
- Allegato 5C Risultati dei L_{KIT} tossico cieco KCl – concentrazioni nominali
- Allegato 5D Risultati dei L_{AL} tossico cieco KCl – concentrazioni nominali

ALLEGATO 5A - Risultati dei laboratori (L_{KIT}) partecipanti al confronto APAT IC006 espressi come numero di organismi immobili (4 repliche per concentrazione) ottenuti nel saggio di tossicità acuta con *D. magna* dopo esposizione per 24 ore al tossico di riferimento $K_2Cr_2O_7$ (concentrazioni nominali e misurate). I valori di EC_{50} -24 h sono stati calcolati dagli organizzatori dell'interconfronto con il metodo Trimmed Spearman-Kärber (TSK) Program version 1.5.

LAB	Prova	Controllo				C_1 0,32 mg/L				C_2 0,56 mg/L				C_3 1,0 mg/L				C_4 1,8 mg/L				C_5 3,2 mg/L				EC ₅₀ - 24 h conc. nominali			Concentrazioni misurate					EC ₅₀ - 24 h conc. misurate						
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	mg/L	L. inf.	L. sup.	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	mg/L	L. inf.	L. sup.				
3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	1	2	1	1	1	4	3	4	5	5	5	5	5	1.134	0,926	1,395	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	3	3	1	5	5	5	5	5	5	5	5	0.979	0,830	1,158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	1	2	2	5	2	5	3	5	5	5	5	1.155	0,958	1,397	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	2	3	3	1	2	4	5	5	4	5	5	5	5	0,926	0,753	1,137	0,32	0,55	0,97	1,74	3,13	0,904	0,738	1,108	-	-	-	
6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3	2	2	1	2	1	4	2	4	4	5	5	5	5	1.081	0,858	1,370	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	2	2	2	1	2	3	5	5	4	4	5	5	5	5	0,845	0,665	1,060	0,25	0,54	0,98	1,76	3,45	0,797	0,607	1,026	-	-	-	
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	1	2	3	5	5	4	4	5	5	5	5	1.063	0,900	1,256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	1,026	-	-	0,24	0,54	0,99	1,78	3,20	1,055	0,904	1,227	-	-	-	
10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	3	3	4	3	2	5	4	5	5	1.343	1,121	1,613	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
13	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	1	2	3	3	5	4	4	5	1,715	1,369	2,258	0,25	0,50	1,05	1,84	3,20	1,740	-	-	-	-	-	-
14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2	2	2	3	5	4	5	4	5	5	5	5	0,997	0,834	1,195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	2	5	3	5	5	5	5	1,598	1,380	1,843	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
17	1	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1	1	3	3	4	3	5	5	5	4	5	5	5	5	0,791	0,653	0,955	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	2	3	4	5	5	5	5	5	5	1,138	0,977	1,339	0,34	0,60	1,07	1,90	3,40	1,212	1,032	1,424	-	-	-	
23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2	4	5	5	5	5	5	5	5	1,069	0,922	1,240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	1	4	2	4	3	5	5	5	5	1,342	1,127	1,601	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
25	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	1	2	3	3	5	4	4	5	1,715	1,369	2,258	0,25	0,50	1,05	1,84	3,20	1,740	-	-	-	-	-	-
26	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	3	5	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5	0,762	0,640	0,907	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	2	2	3	2	5	5	5	4	5	5	5	5	0,903	0,745	1,094	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
27	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	1	2	2	3	3	4	3	5	4	5	3	1,355	1,052	1,746	0,32	0,56	0,96	1,68	2,89	1,264	1,008	1,629	-	-	-	
28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	5	4	5	4	5	5	5	5	1,170	0,986	1,388	0,35	0,61	1,06	1,95	3,57	1,257	1,061	1,497	-	-	-	
30	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	1	3	3	3	3	5	5	4	5	1,452	1,177	1,828	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
31	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	2	3	5	3	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	0,644	0,528	0,777	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	2	2	1	2	4	5	5	4	5	5	5	5	1,050	0,877	1,257	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	3	5	5	5	5	5	5	5	5	0,988	0,852	1,148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2	1	0	0	0	0	2	0	2	1	2	0	2	4	4	1	3	5	4	4	4	5	5	5	5	0,774	0,598	0,979	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
35	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	3	3	3	3	2	2	3	3	2	4	4	5	5	5	0,961	0,692	1,321	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
36	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	2	3	2	2	4	5	4	4	5	5	5	5	1,019	0,839	1,239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
38	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	1	2	1	2	3	4	3	5	5	5	5	1,219	0,972	1,534	0,32	0,56	1,00	1,81	3,21	1,320	1,076	1,639	-	-	-	
39	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	3	4	5	5	5	5	5	1,475	1,281	1,680	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
42	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	3	2	1	2	5	4	4	4	5	5	5	5	1,010	0,820	1,244	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
45	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	2	1	0	4	4	5	4	5	5	5	5	5	0,937	0,766	1,144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
46	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	3	1	1	1	2	2	1	4	4	4	5	4	5	5	5	0,991	0,775	1,265	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	1	1	1	2	1	5	3	3	4	4	5	5	5	1,186	0,948	1,500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
48	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	1	4	3	4	5	4	4	4	1,671	1,378	2,064	0,33	0,58	1,06	1,81	3,20	1,705	1,415	2,089	-	-	-	
54	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	3	3	2	0	4	4	5	4	4	5	5	5	1,123	0,920	1,378	0,35	0,62	1,07	1,97	3,23	1,211	0,996	1,475	-	-	-	
55	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	3	3	3	1	5	4	5	4	5	5	5	5	0,944	0,785	1,136	0,29	0,87	0,94	1,94	3,02	1,075	0,917	1,258	-	-	-	
56	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	1	3	3	2	2	5	5	5	5	1,481	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

continua ALLEGATO 5A

LAB	Prova	Controllo				C ₁ 0,32 mg/L				C ₂ 0,56 mg/L				C ₃ 1,0 mg/L				C ₄ 1,8 mg/L				C ₅ 3,2 mg/L				EC ₅₀ - 24 h conc. nominali			Concentrazioni misurate					EC ₅₀ - 24 h conc. misurate						
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	mg/L	L. inf.	L. sup.	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	mg/L	L. inf.	L. sup.				
59	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1,23	1,12	1,35	-	-	-	-	-	-	-	-
60	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2	0	4	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	1,325	1,115	1,576	0,48	0,62	1,00	1,74	3,35	1,326	1,139	1,572
	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	4	4	5	3	5	5	5	5	5	5	5	5	1,397	-	-	0,48	0,62	1,00	1,74	3,35	1,343	-	-
64	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	1	2	3	3	2	3	5	5	5	5	5	5	5	5	1,371	1,133	1,670	0,32	0,55	0,98	1,80	3,20	1,359	1,121	1,661
65	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	1	4	5	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5	1,257	1,053	1,502	-	-	-	-	-	-	-	-
66	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	2	3	1	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1,028	0,877	1,206	-	-	-	-	-	-	-	-
70	1	0	0	0	0	2	0	0	0	2	1	2	0	4	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,697	0,578	0,837	-	-	-	-	-	-	-	-
71	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	1	4	3	4	3	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,770	0,637	0,928	0,31	0,55	0,99	1,76	3,20	0,770	0,637	0,928
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	2	3	1	3	2	4	3	5	5	4	5	5	5	5	5	1,307	1,056	1,643	0,31	0,55	0,99	1,76	3,20	1,288	1,039	1,621

ALLEGATO 5B - Risultati dei laboratori (L_{AL}) partecipanti al confronto APAT IC006 espressi come numero di organismi immobili (4 repliche per concentrazione) ottenuti nel saggio di tossicità acuta con *D. magna* dopo esposizione per 24 ore al tossico di riferimento K₂Cr₂O₇ (concentrazioni nominali e misurate). I valori di EC₅₀-24 h sono stati calcolati dagli organizzatori dell'interconfronto con il metodo Trimmed Spearman-Kärber (TSK) Program version 1.5

Lab	Prova	Controllo				C ₁ 0,32 mg/L				C ₂ 0,56 mg/L				C ₃ 1,0 mg/L				C ₄ 1,80 mg/L				C ₅ 3,20 mg/L				EC ₅₀ – 24 h Conc. nominali			Concentrazioni misurate					EC ₅₀ – 24 h Conc. misurate		
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	mg/L	L. inf	L. sup	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	mg/L	L. inf	L. sup
1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	3	4	3	5	5	5	5	5	1,341	1,141	1,578	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5	5	5	5	5	5	5	5	1,230	1,12	1,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	3	5	5	5	5	5	5	5	5	0,979	0,830	1,158	0,28	0,55	0,94	1,70	3,07	0,931	0,792	1,096	
4	2	0	0	1	1	0	0	0	0	1	2	3	0	4	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,770	0,650	0,914	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	0,969	0,821	1,146	0,31	0,54	0,96	1,75	3,05	0,934	0,791	1,105	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	0,867	0,728	1,034	0,31	0,54	0,96	1,75	3,05	0,947	0,773	1,159	
15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	3	3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0,897	0,773	1,042	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	5	3	4	4	5	5	5	5	5	1,110	0,924	1,351	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	1	3	2	5	2	5	3	5	5	5	5	5	0,996	0,803	1,237	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	3	2	4	4	5	2	5	5	5	5	5	1,097	0,908	1,328	0,24	0,51	0,92	1,73	3,04	1,017	0,829	1,242	
	2	0	0	0	0	1	1	0	1	2	1	1	1	5	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,665	0,539	0,790	0,24	0,51	0,92	1,73	3,04	0,593	0,468	0,734	
21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,890	0,770	1,027	0,31	0,57	0,99	1,83	3,19	0,888	0,733	1,025	
22	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,968	0,78	1,05	0,29	0,5	0,98	1,78	3,18	0,862	0,741	###	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	0,968	0,78	1,05	0,29	0,5	0,98	1,78	3,18	0,862	0,741	###	
24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,807	0,751	0,997	0,36	0,64	1,12	2,05	3,49	0,967	0,850	1,121	
29	1	0	0	0	0	5	4	6	5	10	10	8	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0,321	0,261	0,363	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	1	0	0	-	-	0	0	-	-	3	1	-	-	1	2	5	5	5	5	5	5	5	5	-	non conforme	0,20	0,30	0,45	0,66	1,00	non conforme	non conforme	non conforme	non conforme	non conforme	non conforme
34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,664	0,581	0,764	0,32	0,57	1,00	1,88	3,11	0,672	0,589	0,771	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	4	1	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,654	0,558	0,767	0,32	0,57	1,00	1,88	3,11	0,622	0,539	0,717	
37	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1,227	1,006	1,508	0,48	0,72	1,08	1,60	2,38	1,235	1,076	1,421	
39	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	5	5	2	5	5	5	5	5	1,420	1,218	1,655	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	4	3	5	5	5	5	1,150	1,311	1,810	0,39	0,61	1,12	1,76	3,58	1,590	1,384	1,879	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3	2	4	3	5	5	5	5	5	1,481	1,240	1,776	0,39	0,61	1,12	1,76	3,58	1,551	1,316	1,859	
41	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	2	1	2	3	4	4	5	4	5	5	5	5	5	0,881	0,708	1,090	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	1	4	2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	0,839	0,685	1,022	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	4	3	4	5	5	5	5	5	5	1,235	1,048	1,455	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	4	3	3	2	5	5	5	5	5	1,456	1,227	1,729	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5	4	5	5	10	10	10	10	10	1,600	1,423	1,801	0,28	0,56	0,99	1,70	3,40	1,556	1,338	1,758	
50	1	0	0	0	0	2	3	3	2	4	3	5	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,347	0,225	0,434	0,34	0,56	1,03	1,80	3,20	0,366	0,243	0,450	
51	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	4	5	4	5	5	5	5	5	5	1,243	1,060	1,458	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1,126	0,972	1,306	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	2	5	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,729	0,620	0,860	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,671	0,574	0,786	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,867	0,751	0,997	0,30	0,55	0,91	1,87	3,23	0,806	0,711	0,923	
57	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	5	4	5	5	5	5	5	5	5	1,041	0,897	1,209	0,36	0,60	1,10	1,83	3,57	1,127	0,971	1,288	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	2	4	5	5	4	5	5	5	5	5	1,036	0,877	1,225	0,36	0,60	1,10	1,83	3,57	1,111	0,945	1,303	

continua ALLEGATO 5B

Lab	Prova	Controllo				C ₁ 0,32 mg/L				C ₂ 0,56 mg/L				C ₃ 1,0 mg/L				C ₄ 1,80 mg/L				C ₅ 3,20 mg/L				EC ₅₀ – 24 h Conc. nominali			Concentrazioni misurate					EC ₅₀ – 24 h Conc. misurate							
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	mg/L	L. inf	L. sup	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	mg/L	L. inf	L. sup					
58	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	5	4	5	5	5	5	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	5	5	5	4	5	5	5	5	1,171	1,002	1,367	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	1	5	5	5	5	5	5	5	1,257	1,053	1,502	0,31	0,54	0,96	1,77	3,25	1,031	0,888	1,204	-	-	-	
68	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	4	3	2	2	4	5	5	4	5	5	5	5	0,920	0,765	1,106	0,34	0,60	1,08	1,85	3,55	0,981	0,817	1,176	-	-	-		
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	4	3	2	2	5	4	4	5	5	5	5	5	0,842	0,672	1,035	0,34	0,60	1,08	1,85	3,55	0,953	0,790	1,148	-	-	-		
69	1	0	0	0	0	1	1	1	2	2	3	1	2	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	0,533	0,424	0,648	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
72	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	3	2	2	3	5	5	5	5	1,609	1,348	1,933	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
73	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	2	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,762	0,640	0,907	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	0	0	0	0	0	2	0	0	1	2	3	1	2	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0,643	0,532	0,771	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
74	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	4	2	3	5	4	4	5	5	5	5	5	0,897	0,747	1,078	0,35	0,63	1,02	1,84	3,32	0,948	0,799	1,128	-	-	-		
	2	1	0	0	0	2	1	3	1	4	2	2	1	3	2	3	2	1	3	4	3	4	3	2	3	1,110	-	-	0,60	0,72	0,84	0,96	1,06	0,818	0,578	0,997	-	-	-		

Note: *EC₅₀ non calcolabile

ALLEGATO 5C - Risultati dei laboratori (L_{KIT}) partecipanti al confronto APAT IC006 espressi come numero di organismi immobili (4 repliche per concentrazione) ottenuti nel saggio di tossicità acuta con *D. magna* dopo esposizione per 24 ore al tossico di riferimento KCl (concentrazioni nominali). I valori di $EC_{50-24 h}$ sono stati calcolati dagli organizzatori dell'interconfronto con il metodo metodo Trimmed Spearman-Kärber version 1.5.

		Controllo				C ₁				C ₂				C ₃				C ₄				C ₅				EC _{50-24 h} conc. nominali							
LAB	Prova	1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	L. inf	L. sup
2	1	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	1	1	0	0	1,00	2	2	1	1	1,25	5	3	3	4	1,085	0,989	1,229
	2	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	0	0	0	0	1,00	0	3	4	3	1,25	3	4	4	5	1,044	0,967	1,128
3	1	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	1	1	1	1	1,00	5	4	5	4	1,25	5	5	5	5	0,840	0,781	0,900
4	1	0	0	0	1	0,25	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	5	5	5	4	1,00	5	5	5	5	1,25	5	5	5	5	*	*	*
	2	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,50	1	0	0	0	0,75	4	2	3	3	1,00	4	5	4	5	1,25	5	5	5	5	0,721	0,646	0,797
	3	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,50	0	1	0	0	0,75	4	2	2	3	1,00	5	5	5	4	1,25	5	5	5	5	0,721	0,649	0,790
	4	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	0	0	1	2	1,00	2	3	4	5	1,25	4	5	4	5	1,012	0,880	1,202
5/24	1	0	0	0	0	0,19	0	1	1	0	0,40	2	0	0	1	0,75	4	2	1	2	1,50	6	6	6	6	3,0	6	6	6	6	0,692		
	2	0	0	0	0	0,125	0	0	0	0	0,25	0	0	1	0	0,50	1	0	1	0	0,75	2	3	2	3	1,50	5	6	6	6	0,795	0,679	0,948
6	1	0	0	0	0	0,18	0	0	0	0	0,32	0	0	0	0	0,56	0	1	0	0	1,00	4	3	3	2	1,80	5	5	5	5	0,914	0,790	1,058
7	1	0	0	0	0	0,180	0	0	1	0	0,360	1	2	1	1	0,72	2	3	2	2	1,40	2	3	5	5	2,80	5	5	5	5	0,704	0,542	0,915
8	1	0	0	0	0	0,1875	0	0	0	0	0,375	1	0	0	0	0,75	2	1	1	1	1,50	5	5	5	5	3,00	5	5	5	5	0,836	0,700	0,997
	2	0	0	0	0	0,20	0	0	0	0	0,50	1	1	0	0	0,75	1	1	2	2	1,00	5	5	4	4	1,50	5	5	5	5	0,773	0,692	0,858
9	1	0	0	0	0	0,1562	0	0	0	0	0,3125	1	1	0	0	0,625	0	0	0	0	1,250	4	5	5	5	2,500	5	5	5	5	0,819		
10	2	0	0	0	0	0,10	0	0	0	1	0,55	0	0	2	0	1,00	5	5	5	5	1,45	5	5	5	5	1,90	5	5	5	5	0,577		
13	1	0	0	0	0	0,0001	0	1	0	0	0,001	0	1	1	1	0,01	0	0	0	0	0,10	0	1	0	0	1,00	5	5	5	5	0,001		
	2	0	0	0	0	0,10	1	0	0	0	0,18	0	0	0	0	0,32	0	0	1	0	0,56	0	1	2	0	1,00	5	5	5	5	0,641		
14	1	0	0	0	0	0,20	0	0	0	0	0,40	0	1	1	0	0,60	1	2	2	1	0,80	4	4	3	4	1,60	5	5	5	5	0,661	0,583	0,762
16	1	0	0	0	0	0,18	0	0	0	0	0,32	0	0	1	1	0,56	5	4	4	5	1,00	5	5	5	5	1,80	5	5	5	5	0,423	0,373	0,480
17	1	0	0	0	0	0,20	1	0	0	0	0,30	1	1	1	0	0,40	1	2	0	1	0,80	3	5	3	4	1,60	5	5	5	5	0,548	0,460	0,671
	2	0	1	0	0	0,20	0	0	1	0	0,50	0	1	0	1	0,60	3	2	2	1	0,80	3	4	4	4	1,00	5	5	5	5	0,626		
19	1	0	0	0	0	0,15	0	0	0	0	0,30	0	0	0	0	0,60	0	0	0	0	1,20	5	4	3	5	2,40	5	5	5	5	0,94	0,84	1,05
23	1	0	0	0	0	0,156	0	0	0	0	0,312	0	0	0	0	0,625	1	1	0	2	1,25	5	5	5	5	2,50	5	5	5	5	*	*	*
	2	0	0	0	0	0,40	0	0	0	0	0,60	0	1	0	0	0,80	4	2	2	2	1,00	5	5	5	5	1,20	5	5	5	5	0,778	0,724	0,828
25	1	0	0	0	0	0,0001	0	0	0	1	0,001	0	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0,10	1	0	0	0	1,00	5	5	5	5	*	*	*
	2	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0,18	0	0	0	0	0,32	0	0	0	0	0,56	0	2	2	2	1,00	5	5	5	4	0,647	0,564	0,746
26	1	0	0	0	0	0,625	0	0	0	0	0,71	1	1	2	2	0,83	4	4	3	3	1,00	5	5	4	5	1,25	5	5	5	5	0,781	0,744	0,823
	2	1	1	0	0	0,625	0	0	0	0	0,71	0	3	2	2	0,83	3	5	5	5	1,00	5	5	5	5	1,25	5	5	5	5	0,741	0,714	0,772
27	1	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	0,50	1	0	1	0	1,00	5	5	5	5	1,50	5	5	5	5	2,00	5	5	5	5	*	*	*
	2	0	0	0	0	0,50	1	0	0	0	0,60	1	1	0	0	0,70	1	1	2	2	0,80	4	4	3	1	0	5	3	4	4	0,764	0,717	0,824
28	1	0	0	0	0	0,05	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	1,50	5	5	5	5	2,50	5	5	5	5	*	*	*
	2	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	1	2	3	2	1,00	4	5	5	4	1,25	5	5	5	5	1,50	5	5	5	5	0,790	0,719	0,853
30	1	0	1	0	0	0,20	0	0	0	0	0,60	1	0	0	0	1,00	4	2	3	3	1,20	4	4	4	5	1,6	5	5	5	5	0,924	0,816	1,015

continua ALLEGATO 5C

LAB	Prova	Controllo				C ₁				C ₂				C ₃				C ₄				C ₅				EC ₅₀ -24 h conc. nominali							
		1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	1	2	3	4	g/L	L. inf	L. sup
31	1	0	0	0	0	0,20	0	0	0	0	0,33	0	1	2	1	0,55	2	1	3	2	0,91	4	4	5	5	1,60	5	5	5	5	0,564	0,464	0,644
32	2	0	0	0	0	0,156	0	0	0	0	0,325	0	0	0	0	0,62	0	1	0	0	1,25	5	5	5	5	2,50	5	5	5	5	0,85	0,80	0,91
33	1	1	0	1	0	0,20	2	3	2	3	0,50	2	3	4	2	0,90	5	5	5	5	1,20	5	5	5	5		5	5	5	5	0,256		
	2	0	0	0	0	0,20	0	0	0	1	0,40	0	0	0	0	0,60	2	2	2	2	0,80	3	5	4	5	1,60	5	5	5	5	0,619		
35	1	0	0	0	0	0,05	0	0	0	0	0,50	2	2	1	1	5,00	5	5	5	5											*	*	*
	2	0	0	0	0	0,25	0	0	0	2	0,50	1	1	1	1	1,00	3	3	2	1	2,00	4	5	4	4	4,00	5	5	5	5	0,995	0,792	1,250
36	1	0	0	0	0	0,20	0	0	1	0	0,40	0	0	1	1	0,80	2	3	3	3	1,00	5	5	5	5	1,60	5	5	5	5	0,612		
	2	0	0	0	0	0,20	0	0	1	0	0,40	0	1	1	1	0,60	1	2	2	2	0,80	2	3	3	3	1,00	5	5	5	5	0,635		
38	11	0	0	0	0	0,20	0	0	0	0	0,32	0	0	0	0	0,56	0	0	0	1	1,00	3	2	3	3	1,80	5	5	5	5	0,938	0,810	1,088
42	1	0	0	0	0	0,10	0	1	0	0	0,32	0	0	0	0	0,56	0	0	0	0	1,00	5	4	4	4	1,80	5	5	5	5	0,764		
45	1	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	0,50	1	2	1	1	1,00	5	5	5	5											*	*	*
	2	0	0	0	0	0,16	0	0	0	0	0,24	0	0	0	1	0,32	1	0	0	0	0,56	1	1	1	1	1,00	5	5	5	5	0,613		
46	1	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	3	4	4	4	1,00	5	5	5	5	1,50	5	5	5	5	2,00	5	5	5	5	*	*	*
	2	0	0	0	0	0,50	0	1	0	0	0,75	4	5	4	4	1,00	5	5	5	5	1,50	5	5	5	5	2,00	5	5	5	5	0,641	0,583	0,697
48	2	0	0	0	0	0,18	0	0	0	0	0,32	0	0	1	0	0,56	1	5	2	2	1,00	5	5	5	5	1,80	5	5	5	5	0,541	0,468	0,626
54	1	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	0,30	0	0	0	0	0,60	1	0	0	0	1,20	5	5	5	5	2,00	5	5	5	5	*	*	*
	2	0	0	0	0	0,30	0	0	0	0	0,60	0	0	0	0	0,70	2	0	1	1	0,90	4	4	1	4	1,20	5	5	5	5	0,829	0,777	0,892
55	1	0	0	0	0	0,20	0	0	0	0	0,40	0	0	0	0	0,80	2	3	1	4	1,60	4	5	5	5	3,20	5	5	5	5	0,838	0,702	1,000
56	1	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	0,30	0	0	0	1	0,66	1	0	0	1	1,38	5	5	4	5	2,82	5	5	5	5	0,857		
59	1	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	1	1	0	0	1,00	2	2	1	1	1,25	5	3	3	4	1,085	0,989	1,229
	2	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	0	0	0	0	1,00	0	3	4	3	1,25	3	4	4	5	1,044	0,967	1,128
60	1	0	0	0	1	0,20	0	0	0	0	0,50	0	2	2	3	0,70	3	3	2	1	0,90	5	4	5	5	1,30	5	5	5	5	0,618	0,531	0,691
	2	0	0	0	1	0,25	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	2	1	2	4	1,00	5	5	5	5	1,25	5	5	5	5	0,730	0,660	0,793
64	1	1	0	0	0	0,20	0	0	0	0	0,40	0	0	0	0	0,80	2	3	3	2	1,20	5	5	5	5	1,60	5	5	5	5	0,805	0,677	0,898
65	1	0	0	0	0	0,30	0	0	0	0	0,65	0	0	1	0	0,80	2	2	1	1	0,90	3	1	3	3	1,25	5	5	5	5	0,878	0,826	0,946
66	1	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	1,00	5	5	5	4	2,00	5	5	5	5	4,00	5	5	5	5	*	*	*
	2	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,75	3	0	2	3	1,00	4	5	5	5	1,50	5	5	5	5	2,00	5	5	5	5	0,839	0,757	0,928
70	1	0	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0,16	3	1	0	1	0,312	4	1	3	0	0,60	5	5	5	5	1,25	5	5	5	5	0,275	0,223	0,340
71	1	0	0	0	0	0,49	1	2	0	1	0,74	5	5	5	5	1,11	5	5	5	5	1,67	5	5	5	5	2,50	5	5	5	5	*	*	*
	2	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0,70	1	0	1	0	0,90	3	1	3	3	1,20	5	5	5	5	1,50	5	5	5	5	0,877	0,817	0,943

Note: * EC₅₀ non calcolabile

ALLEGATO 5D - Risultati dei laboratori (L_{AL}) partecipanti al confronto APAT IC006 espressi come numero di organismi immobili (4 repliche per concentrazione) ottenuti nel saggio di tossicità acuta con D. magna dopo esposizione per 24 ore al tossico cieco KCl (concentrazioni nominali). I valori di EC_{50-24 h} sono stati calcolati dagli organizzatori dell'interconfronto con il metodo metodo Trimmed Spearman-Kärber version 1.5.

LAB	Prova	Controllo				C ₁				C ₂				C ₃				C ₄				C ₅				EC _{50-24 h} concentrazioni nominali													
		n° org. iniz.	n° immobili				c.n. g/L	n° org. iniz.	n° immobili				c.n. g/L	n° org. iniz.	n° immobili				c.n. g/L	n° org. iniz.	n° immobili				c.n. g/L	n° org. iniz.	n° immobili				g/L	L. inf	L. sup						
			1	2	3	4			1	2	3	4			1	2	3	4			1	2	3	4			1	2	3	4				1	2	3	4		
1	2	20	0	0	0	0	0,40	20	0	0	0	0	0,60	20	1	0	0	1	0,80	20	1	2	1	0	1,00	20	1	2	2	1	1,20	20	2	3	4	3	0,948	*	*
3	2	20	0	0	0	0	0,25	20	0	0	0	0	0,50	20	0	0	0	0	0,75	20	0	0	0	0	1,00	20	4	5	5	4	1,25	20	5	5	5	5	*	*	*
4	1	20	0	0	0	1	0,25	20	0	0	0	0	0,50	20	1	2	1	1	0,75	20	4	4	4	4	1,00	20	4	5	5	5	1,25	20	5	5	5	5	0,603	0,524	0,672
	2	20	0	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0	0,40	20	0	0	0	1	0,60	20	1	2	3	3	0,80	20	3	2	3	3	1,00	20	5	4	3	4	0,708	0,619	0,817
11	1	20	0	0	0	0	0,50	20	0	0	0	0	0,70	20	0	1	0	1	0,90	20	2	2	2	3	1,10	20	3	4	4	4	1,30	20	5	5	4	5	0,931	0,859	1,002
	2	20	0	0	0	0	0,50	20	0	0	0	0	0,70	20	2	2	1	1	0,90	20	3	2	2	2	1,10	20	4	3	3	4	1,30	20	4	4	5	5	0,903	0,818	0,994
15	1	24	0	0	0	0	0,16	24	0	0	0	0	0,31	24	0	0	0	0	0,62	24	5	4	5	4	1,3	24	6	6	6	6	2,50	24	6	6	6	6	*	*	*
	2	24	0	0	0	0	0,16	24	0	0	0	0	0,31	24	1	0	1	2	0,62	24	3	3	3	3	1,3	24	6	6	6	6	2,50	24	6	6	6	6	0,545	0,456	0,651
18	1	20	0	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0	0,34	20	1	0	0	0	0,56	20	2	1	2	0	1,00	20	3	3	3	2	1,60	20	5	5	5	4	0,827	0,692	0,998
	2	20	0	0	0	0	0,35	20	0	0	0	0	0,60	20	1	0	0	0	0,75	20	2	2	1	1	1,20	20	5	5	2	2	1,60	20	5	5	5	5	0,937	0,837	1,053
20	1	20	0	0	0	0	0,10	20	0	0	0	0	0,22	20	0	0	0	0	0,50	20	0	2	0	0	1,10	20	2	1	2	5	2,40	20	5	5	5	5	0,998	0,804	1,235
	2	20	0	0	0	0	0,10	20	0	0	0	0	0,22	20	0	0	0	1	0,50	20	1	0	0	0	1,10	20	3	1	5	2	2,40	20	5	5	5	5	0,946	*	*
	3	20	0	0	0	0	0,10	20	0	0	0	0	0,22	20	0	0	1	0	0,50	20	1	0	1	0	1,10	20	3	4	4	5	2,40	20	5	5	5	5	0,752	0,600	0,941
21	1	20	0	0	0	0	0,12	20	0	0	0	0	0,24	20	0	0	0	0	0,42	20	0	0	0	0	0,8	20	5	4	5	4	2,40	20	5	5	5	5	*	*	*
	2	20	0	0	0	0	0,42	20	0	0	0	0	0,50	20	1	1	2	1	0,60	20	2	2	3	3	0,8	20	5	5	5	5	1,35	20	5	5	5	5	0,575	0,543	0,611
22	1	20	0	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0	0,40	20	2	3	2	2	0,60	20	5	5	5	5	0,80	20	5	5	5	5	1,00	20	5	5	5	5	*	*	*
	2	20	0	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0	0,40	20	3	4	2	2	0,60	20	5	5	5	5	0,80	20	5	5	5	5	1,00	20	5	5	5	5	*	*	*
24	1	20	0	0	0	0	0,70	20	0	0	0	0	0,90	20	0	0	0	0	1,10	20	3	2	2	1	1,30	20	5	4	5	4	1,60	20	5	5	5	5	1,137	1,082	1,190
29	1	40	0	0	0	0	0,10	40	2	1	2	3	0,50	40	8	7	9	8	0,90	40	10	10	10	10	1,30	40	10	10	10	10	1,70	40	10	10	10	10	0,189	0,145	0,238
31	1	20	0	0	0	0	0,20	10	0	0	-	-	0,33	10	0	0	-	-	0,55	10	0	0	-	-	0,9	10	4	5	-	-	1,60	10	5	5	-	-	non conforme		
	2	10	0	0	-	-	0,60	10	0	1	-	-	0,68	10	2	2	-	-	0,77	10	3	3	-	-	0,9	10	5	5	-	-	1,00	10	5	5	-	-	non conforme		
34	1	20	0	0	0	0	0,18	20	0	0	0	0	0,25	20	0	0	0	0	0,35	20	2	2	1	1	0,50	20	5	5	5	4	0,71	20	5	5	5	5	0,383	0,352	0,418
	2	20	0	0	0	0	0,18	20	0	0	0	0	0,25	20	0	0	0	0	0,35	20	3	2	1	3	0,50	20	5	5	4	5	0,71	20	5	5	5	5	0,365	0,335	0,339
37	1	10	0	-	-	-	0,05	10	0	-	-	-	0,15	10	0	-	-	-	0,45	10	0	-	-	-	1,40	10	8	-	-	-	4,10	10	10	-	-	-	*	*	*
	2	20	0	0	0	0	0,40	20	0	0	0	0	0,64	20	1	0	1	0	1,02	20	4	4	3	4	1,64	20	5	5	5	5	2,62	20	5	5	5	5	0,866	0,770	0,975
39	1	20	0	0	0	0	0,10	20	0	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0	0,40	20	0	0	0	0	0,90	20	3	0	2	1	2,00	20	5	5	5	5	*	*	*
40	1	20	0	0	0	0	0,40	20	1	1	0	0	0,55	20	1	1	0	1	0,65	20	1	0	2	3	0,80	20	5	5	5	5	1,10	20	5	5	5	5	0,641	*	*
	2	20	0	0	0	0	0,40	20	1	0	0	0	0,55	20	1	0	1	0	0,65	20	1	0	2	3	0,80	20	4	4	5	5	1,10	20	5	5	5	5	0,673	*	*
41	1	20	0	0	0	0	0,25	20	0	0	0	1	0,50	20	0	0	1	1	0,75	20	2	0	1	1	1,00	20	3	2	3	1	1,25	20	5	5	5	5	0,886	*	*
	2	20	0	0	0	0	1,00	20	3	3	3	3	1,05	20	4	5	5	4	1,10	20	4	5	5	5	1,15	20	5	5	5	5	1,20	20	5	5	5	5	0,993	0,905	1,010
43	1	5	0	-	-	-	0,40	5	0	-	-	-	0,80	5	0	-	-	-	0,90	20	4	3	2	2	1,50	20	5	5	5	4	1,60	5	5	5	5	5	0,926	0,788	1,045
44	1	20	0	0	0	0	0,16	20	0	0	0	0	0,31	20	0	0	0	0	0,63	20	0	0	0	0	1,3	20	0	0	0	0	2,50	20	5	5	5	5	*	*	*
	2	20	0	0	0	0	1,25	20	0	0	0	0	1,50	20	3	3	2	3	1,80	20	5	5	5	5	2,00	20	5	5	5	5	2,50	20	5	5	5	5	*	*	*
49	1	40	0	0	0	0	0,12	40	0	0	0	0	0,30	40	1	0	3	1	0,73	40	10	10	8	9	1,60	40	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	0,445	0,390	0,510

continua ALLEGATO 5D

Lab	Prova	Controllo				C ₁				C ₂				C ₃				C ₄				C ₅				EC ₅₀ -24 h concentrazioni nominali							
		n° org. iniz	n° immobili				c.n.	n° org. iniz	n° immobili				c.n.	n° org. iniz	n° immobili				c.n.	n° org. iniz	n° immobili				c.n.	n° org. iniz	n° immobili				g/L	L. inf	L. sup
			1	2	3	4			g/L	1	2	3			4	g/L	1	2			3	4	g/L	1			2	3	4	g/L			
50	1	10	0	-	-	0,20	10	2	-	-	0,40	10	10	-	-	0,80	10	10	-	-	1,20	10	10	-	-	1,60	10	10	-	-	*	*	*
	2	20	0	0	0	0,20	20	1	1	2	0,25	20	4	3	3	0,30	20	4	4	5	0,4	20	5	5	5	0,40	20	5	5	5	0,229	0,207	0,245
51	1	20	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0,40	20	5	5	5	0,80	20	5	5	5	1,00	20	5	5	5	1,60	20	5	5	5	*	*	*
	2	20	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0,25	20	0	1	0	0,30	20	1	1	0	0,4	20	4	2	4	0,40	20	5	5	5	0,334	0,318	0,351
52	1	20	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0,50	20	0	0	0	0,70	20	0	0	0	1,00	20	0	0	0	1,30	20	4	1	4	*	*	*
	2	20	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0,50	20	0	0	0	0,70	20	0	0	0	1,00	20	0	0	0	1,30	20	0	3	5	*	*	*
53	1	20	0	0	0	0,10	20	0	0	0	0,22	20	0	0	0	0,50	20	5	5	5	1,1	20	5	5	5	2,51	20	5	5	5	*	*	*
	2	20	0	0	0	0,18	20	0	0	0	0,25	20	0	0	0	0,35	20	3	3	3	0,50	20	4	5	5	0,71	20	5	5	5	0,365	0,335	0,399
57	1	20	0	0	0	0,50	20	0	0	0	0,70	20	3	2	3	0,90	20	5	4	3	1,10	20	5	4	5	1,30	20	5	5	5	0,730	0,667	0,788
	2	20	0	0	0	0,50	20	0	1	1	0,70	20	2	1	3	0,90	20	4	4	5	1,10	20	5	3	5	1,30	20	5	5	5	0,716	0,640	0,788
58	1	20	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0,40	20	0	0	0	0,80	20	0	0	0	1,60	20	4	5	4	3,20	20	5	5	5	*	*	*
	2	20	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0,80	20	0	0	0	1,60	20	5	5	4	2,00	20	5	5	5	2,50	20	5	5	5	*	*	*
61	1	20	0	0	0	0,80	20	0	0	0	1,00	20	0	1	0	1,20	20	1	1	2	1,40	20	3	3	2	1,60	20	5	5	5	1,304	1,236	1,374
	2	20	0	0	0	0,25	20	0	0	0	0,38	20	0	0	0	0,57	20	0	0	0	0,9	20	0	0	1	1,30	20	5	5	4	*	*	*
63	1	20	0	0	0	0,80	20	0	0	0	0,92	20	0	1	0	1,05	20	1	0	0	1,2	20	4	4	5	1,40	20	5	5	5	1,132	1,086	1,181
	2	20	0	0	0	0,50	20	1	0	0	0,70	20	3	3	2	0,90	20	3	3	3	1,10	20	5	4	5	1,30	20	5	5	5	0,737	0,660	0,808
68	1	20	1	0	0	0,50	20	0	2	0	0,70	20	5	3	3	0,90	20	4	4	5	1,10	20	5	5	5	1,30	20	5	5	5	0,655	0,594	0,712
	2	20	1	0	0	0,50	20	0	2	0	0,70	20	5	3	3	0,90	20	4	4	5	1,10	20	5	5	5	1,30	20	5	5	5	0,655	0,594	0,712
69	1	20	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0,40	20	0	0	0	1,00	20	3	4	4	1,40	20	4	5	4	1,60	20	5	5	5	0,890	0,685	1,023
	2	20	0	0	0	0,60	20	0	0	0	0,80	20	0	2	0	1,00	20	4	4	4	1,40	20	4	5	4	1,60	20	5	5	5	0,967	0,888	1,053
72	1	20	0	0	0	0,18	20	0	0	0	0,25	20	0	0	0	0,38	20	1	1	1	0,50	20	2	3	2	0,75	20	5	5	5	0,477	0,435	0,529
	2	20	0	0	0	0,20	20	0	0	0	0,34	20	0	0	0	0,58	20	0	0	0	1	20	0	0	0	1,67	20	5	5	5	*	*	*
73	1	20	0	0	0	0,82	20	0	0	0	0,98	20	0	0	1	1,18	20	0	0	1	1,4	20	1	2	2	1,70	20	5	5	5	1,403	0,734	Inf.
	2	20	0	0	0	0,10	20	0	0	0	0,25	20	0	0	1	0,50	20	2	2	0	2	1,3	20	5	3	5	2,50	20	5	5	5	0,608	0,481
74	1	20	1	0	0	0,40	20	2	0	1	0,60	20	0	3	1	0,75	20	3	2	1	0,80	20	4	3	4	1,00	20	5	2	4	0,757	0,641	0,958
	2	20	1	0	0	0,40	20	2	0	1	0,60	20	0	3	1	0,75	20	3	2	1	0,80	20	4	3	4	1,00	20	5	2	4	0,757	0,641	0,958

Note: * EC₅₀ non calcolabile

6. “APAT-IC012” Parametri chimici ed ecotossicologici su lisciviato ottenuto da una matrice solida (rifiuto – suolo contaminato)

Scopo	Analisi dei risultati di misure chimiche ed ecotossicologiche su un lisciviato di un suolo contaminato- rifiuto, ottenuto dai laboratori secondo il metodo UNI EN 12457-2: 2004.
Saggio Tossico di riferimento Tossico cieco Sistema di saggio	Tossicità acuta 24 ore (h) con organismi provenienti da forme criptobiotiche (uova durature o ehippi) o da allevamento dicromato di potassio (K ₂ Cr ₂ O ₇) Lisciviato da terreno contaminato con concentrazioni di metalli medio- alte –APAT RM015 . Neonati (< 24 h) di <i>Daphnia magna</i> sono esposti ad almeno cinque concentrazioni di lisciviato di APAT RM015 per un periodo di 24 ore.
Numero di Partecipanti	*59: ARPA/APPA
Valore di consenso	EC ₅₀ ottenuto quale media robusta, anti-trasformata, dei valori logaritmici di EC ₅₀ -24h (SOFTWARE AMC, ISO 13528:2005). Al valore assegnato sono associati un limite inferiore ed uno superiore di attenzione, pari rispettivamente al valore assegnato più o meno due volte il valore dello scarto tipo robusto derivato dall’analisi dei risultati.
Dettagli del saggio	Saggio di tossicità acuta (24 h) su lisciviato del materiale di prova (RM015) e su il tossico di riferimento dicromato di potassio, K ₂ Cr ₂ O ₇ . La risposta del sistema di saggio viene valutata come EC ₅₀ -24 h (ISO 6341) ovvero come concentrazione iniziale (presente all’inizio del test) che in 24 ore immobilizza il 50% degli organismi esposti.

* Hanno partecipato 59 laboratori, di cui 48 hanno restituito i risultati finali richiesti (tabella 6.1). A ciascuno dei laboratori è stato assegnato un codice identificativo cui sono associati anche i risultati restituiti ed elaborati.

6.1 Materiali

Per l’esecuzione della prova sono stati distribuiti 3 diversi materiali di prova:

- ✓ -materiale di riferimento APAT RM015, su cui applicare le prove di lisciviazione per le successive misure chimiche ed ecotossicologiche;
- ✓ -un tossico di riferimento per le misure ecotossicologiche;
- ✓ -una soluzione incognita contenente metalli per le misure chimiche.

Caratteristiche dei materiali:

- APAT RM015
Solido costituito da terreno contaminato da rifiuti, con concentrazioni di metalli medio- alte- APAT RM015. Il suolo grezzo di partenza è stato setacciato e macinato con mulino planetario a sfere (agata) fino a una granulometria < 90 µm. La distribuzione granulometrica è stata verificata con granulometro laser. Successivamente, il materiale è stato omogeneizzato in un agitatore rotante (per circa un mese) alla velocità di 48 giri/minuto. Previa verifica dell’omogeneità, è stato quindi aliquotato in bottiglie di vetro scuro da 50 mL con tappo a vite e sottotappo in PE. Ciascuna bottiglia conteneva circa 26 g di materiale. Il materiale al momento del ricevimento in laboratorio è stato conservato a temperatura ambiente.
- Tossico di riferimento
Sale dicromato di potassio K₂Cr₂O₇ in quantità di circa circa 3 g (Carlo Erba reagenti, CAS 7778-50-9), in provette trasparenti in PE (volume 5 mL). Conservato a temperatura ambiente e al riparo dalla luce fino al momento dell’uso.

Tabella 6.1 – Laboratori ARPA/APPA che hanno restituito i risultati delle prove previste dal confronto interlaboratorio APAT IC012

Ente	Nome e cognome
APPA-Bolzano, Laboratorio analisi acqua - Laboratorio biologico	Luciano Fracalossi
ARPACal Laboratorio Chimico DAP Cosenza	Rosaria Chiappetta
ARPACal Laboratorio Chimico DAP Reggio Calabria	Beniamino Mazza
ARPAC - Dipartimento Tecnico Provinciale di Napoli, Laboratorio Specializzato Ecotossicologia	Marialuisa Gallo
ARPA FVG Dipartimento di Udine, Servizio tematico analitico	Stefano Pison
ARPA FVG Dipartimento di Pordenone, Servizio tematico analitico	Clorinda Del Bianco
ARPA Lazio - Sezione Provinciale di LATINA	Roberta Corona
ARPAL Liguria - Laboratorio provinciale di La Spezia	Claudio Grillo
ARPAL Liguria - Laboratorio provinciale di Savona	Christian Tiberiade
ARPA Lombardia - Laboratorio di Oggiono (Lecco)	Marco Volante
ARPA Lombardia - Laboratorio di Pavia	Maurizio Maierna
ARPA Lombardia - Laboratorio di Parabiago	Maria Angela Pasini
ARPA Lombardia - Laboratorio di Brescia	Laura Clerici
ARPA Lombardia - Laboratorio di Cremona	Patrizia Vannini
ARPA Lombardia - Laboratorio di Varese	Rosanna Casali
ARPA Marche - Dipartimento di Macerata SERVIZIO RIFIUTI/SUOLO - ACQUE	Giorgio Catella
ARPA Molise - Dipartimento di Isernia, Laboratorio CHIMICO	Tristano Leoni
ARPA Molise - Dipartimento di Campobasso - Laboratorio CHIMICO	Maria Grazia Cerroni
ARPA Piemonte S.S. 02.09 - Attività strumentali di laboratorio del quadrante Sud-Ovest – sede di Cuneo	Carmine Tarasco
ARPA Piemonte S.S. 02.10 - Attività strumentali di laboratorio del quadrante Nord-Est - sede di Vercelli	Alberto Pelizzetti
ARPA Piemonte S.S. 02.11 - Attività strumentali di laboratorio del quadrante Nord-Ovest - sede di Grugliasco	Romana Azario Cozet
ARPA Emilia Romagna, Sezione di RAVENNA Dipartimento Tecnico	Gerardo Melchionna
ARPA Sicilia - DAP Caltanissetta	Laura Billi
ARPA Sicilia - DAP Messina	Antonio Carbone
ARPA Sicilia - DAP Palermo	Giovanni Patti
ARPAS Dipartimento Carbonia Iglesias	Filippo Pinio
ARPAS Dipartimento di Oristano	Maria Cossu
ARPAS Dipartimento di Cagliari	Luisa Piroso
ARPAS Dipartimento di Nuoro	M.Patrizia Usai
ARPAS Dipartimento di Sassari	Anna Maria Piroddi
ARPAT Dipartimento provinciale Grosseto	Pietro Caria
ARPAT Dipartimento provinciale Arezzo	Fabrizio Martelli
ARPAT Dipartimento provinciale Firenze	Patrizia Bolletti
ARPAT Dipartimento provinciale Pisa	Andrea D'Elia
ARPAT Servizio Sub-provinciale di Piombino	Maria Letizia Franchi
ARPAT Dipartimento provinciale Siena	Antonella Grilli
ARPA Umbria –U.O.L.M. PERUGIA, LABORATORIO PERUGIA	Valeria Vigni
ARPA Valle d'Aosta - Servizio Tecnico – Sezione Laboratorio	Peirone Eugenia,
ARPAV Veneto, Dipartimento Regionale Laboratori - Servizio Laboratorio Provinciale di Belluno	Elisabetta Ciccarelli
ARPAV Veneto, Dipartimento Regionale Laboratori - Servizio Laboratorio Provinciale di Padova	Cristina Gibellino
ARPAV Veneto, Dipartimento Regionale Laboratori - Servizio Laboratorio Provinciale di Treviso	Fabio Decet
ARPAV Veneto, Dipartimento Regionale Laboratori - Servizio Laboratorio Provinciale di Venezia	Gloria Bandettini
ARPAV Dipartimento Regionale Laboratori - Servizio Laboratorio Provinciale di Verona	Alfredo Mussato
ARPAV Veneto, Dipartimento Regionale Laboratori - Servizio Laboratorio Provinciale di Vicenza	Michele Gerotto
ARTA Dipartimento Provinciale di L'Aquila - Settore Chimico	Alberto Oggheri
ARTA Dipartimento Provinciale di Chieti – Settore Chimico Ambientale	Enzo Dainese
ARTA Dipartimento Provinciale di Pescara - Settore Biotossicologico e Settore Chimico Ambientale	Domenica Flammini
ARTA Dipartimento Provinciale di Teramo Settore Chimico Ambientale	Franco De Risio
	Arturo Scamosci
	Federico Detti

6.2 Disegno sperimentale

Materiali di partenza: un suolo contaminato di riferimento, una soluzione di riferimento contenente metalli a concentrazione di massa incognita (per le prove chimiche) e un tossico di riferimento (per le prove ecotossicologiche).

Il disegno sperimentale, vedi Figura 6.1, prevede la lisciviazione del materiale di riferimento e l'esecuzione su aliquote diverse del lisciviato ottenuto di prove chimiche per la determinazione dei metalli e di test ecotossicologici.

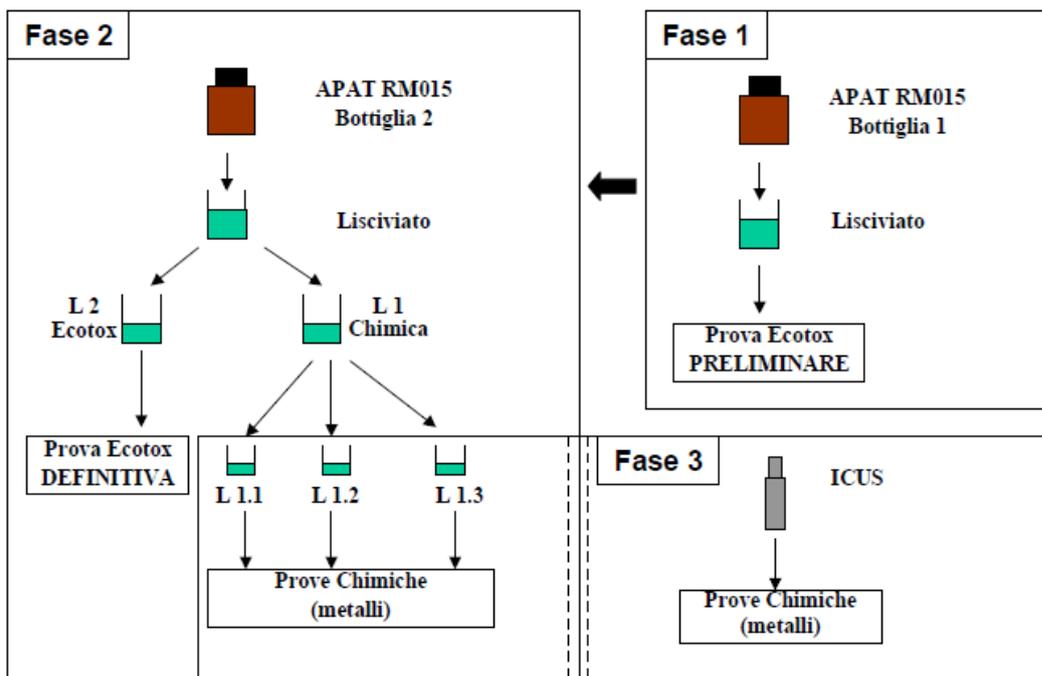


Figura 6.1 – Schema sperimentale del confronto interlaboratorio APAT IC012

In particolare, l'introduzione nel disegno di test preliminari per la prova ecotossicologica ha lo scopo di consentire la messa a punto delle condizioni analitiche necessarie allo svolgimento del saggio. La richiesta è di individuare la diluizione corretta da effettuare sul lisciviato di RM015. Tale esigenza è emersa come risultato delle prove effettuate prima dell'avvio del circuito stesso nell'ambito dello studio di fattibilità eseguito dall'ex Servizio di Metrologia Ambientale. Da queste è risultato un valore di pH del lisciviato di RM15 al 100% pari a $4,56 \pm 0,05$; $n = 36$, valore troppo acido e critico per la vitalità dei crostacei.

Il disegno consente di evidenziare la presenza di eventuali effetti matrice nella determinazione dei metalli, e per le misure ecotossicologiche (inibizione della mobilità del crostaceo *Daphnia magna*), oltre alla dispersione dei risultati dei laboratori, di raccogliere informazione sulle modalità di esecuzione e di applicazione del metodo di misura.

6.3 Test di tossicità acuta (24 h) con *Daphnia*

6.3.1 Principio del saggio

Neonati di *Daphnia* (età < 24 h) sono esposti ad almeno cinque concentrazioni di lisciviato di APAT RM015 per un periodo di 24 ore. La risposta del sistema di saggio viene valutata come concentrazione iniziale (cioè presente all'inizio del test) che in 24 ore immobilizza il 50% degli organismi esposti e cioè come EC_{50-24} h (ISO 6341). Un saggio di tossicità acuta (24 h) con il tossico di riferimento dicromato di potassio, $K_2Cr_2O_7$, è inoltre eseguito per valutare la sensibilità degli organismi utilizzati. La risposta è, anche in questo caso, valutata come EC_{50-24} h.

6.3.2 Organismi

Il sistema di saggio è costituito da neonati di *Daphnia magna* Straus nati da meno di 24 ore. I laboratori aderenti alla prova hanno utilizzato organismi provenienti da allevamenti e/o da forme criptobiotiche. I ventisei (26/48) laboratori che hanno impiegato organismi d'allevamento (L_{AL}) sono stati lasciati liberi di eseguire il test di tossicità acuta con il metodo di prova normalmente in uso presso il proprio laboratorio. Come mostrato nella tabella 6.2 la maggior parte dei L_{AL} (16/26) ha utilizzato il metodo APAT IRSA (2003), 4/26 laboratori hanno utilizzato il metodo UNI EN ISO 6341, un laboratorio ha impiegato un metodo interno, mentre 4/26 laboratori non hanno fornito indicazioni sul metodo.

Tabella6.2 - Metodi di prova utilizzati dai L_{AL}

Codice laboratorio	Metodo utilizzato
01	APAT-IRSA 2003
04	APAT-IRSA 2003
06	APAT-IRSA 2003
12	UNI EN ISO 6341
13	UNI EN ISO 6341
14	UNI EN ISO 6341
19	IRSA versione Sbrilli
20	APAT-IRSA 2003
21	APAT-IRSA 2003
22	Non indicato
23	APAT-IRSA 2003
24	UNI EN ISO 6341
26	APAT-IRSA 2003
28	APAT-IRSA 2003
31	APAT-IRSA 2003
33	APAT-IRSA 2003
34	APAT-IRSA 2003
35	APAT-IRSA 2003
43	Non indicato
45	Non indicato
49	APAT-IRSA 2003
52	APAT-IRSA 2003
53	APAT-IRSA 2003
55	Non indicato
56	APAT-IRSA 2003
57	APAT-IRSA 2003

Ventidue laboratori (22/48) hanno eseguito la prova con le forme cripto biotiche (L_{KIT}). Per questi è stato reso obbligatorio l'utilizzo di organismi provenienti da uno stesso lotto di produzione (DM 070508) e l'esecuzione dei saggi di tossicità secondo il protocollo loro fornito.

6.3.3 Acqua di diluizione e mantenimento degli organismi

Per tutti i laboratori (L_{AL} e L_{KIT}) partecipanti è stato reso obbligatorio, per il mantenimento degli organismi e la preparazione delle soluzioni di lisciviato e di tossico di riferimento, l'utilizzo di acqua preparata in accordo alla norma UNI EN ISO 6341:99. Nel caso dell'utilizzo del kit l'acqua pura da utilizzare per la preparazione deve avere una conducibilità < 1 µS/cm. Nel caso dei laboratori che hanno effettuato le prove con organismi di allevamento, il valore di riferimento massimo di conducibilità per l'acqua pura è di 10 µS/cm. Il pH finale dell'acqua deve avere un valore pari a 7,8±0,2.

6.3.4 Prova di lisciviazione di APAT RM015

L'esercizio ha previsto l'esecuzione di un'unica prova di lisciviazione su circa 20 grammi di materiale APAT RM015 conformemente alla norma UNI EN 12457-2:2004 "Caratterizzazione dei rifiuti - Lisciviazione - Prova di conformità per la lisciviazione di rifiuti granulari e di fanghi - Parte 2: Prova a singolo stadio, con un rapporto liquido/solido di 10 l/kg, per materiali con particelle di dimensioni minori di 4 mm (con o senza riduzione delle dimensioni)."

La quantità inferiore di campione fornito rispetto a quanto indicato dalla norma suddetta è giustificata dalla sua granulometria estremamente fine (< 90 µm) e conseguente elevata omogeneità.

Come mostrato nello schema sperimentale (Figura 6.1), i laboratori hanno misurato il volume di lisciviato ottenuto e prelevato porzioni separate per le misure chimiche e le misure ecotossicologiche.

6.3.5 Prove di tossicità con lisciviato di APAT RM015 e con il tossico di riferimento

Sono state richieste 3 prove:

1. saggio preliminare di inibizione della mobilità di *Daphnia magna* (per la determinazione dell'intervallo di concentrazioni su lisciviato di APAT RM015);
2. saggio definitivo della durata di 24 ore sul lisciviato di APAT RM015;
3. saggio di inibizione della mobilità di *Daphnia magna* della durata di 24 ore (h) con il tossico di riferimento, dicromato di potassio (K₂Cr₂O₇).

Quest'ultimo richiesto per la valutazione della sensibilità degli organismi, nonché della corretta esecuzione dei saggi di tossicità.

Con riferimento alla prova 2 ed alla prova 3 è stato richiesto di restituire :

- Il valore di EC₅₀-24 h sul lisciviato di APAT RM015, determinato secondo il metodo di calcolo in uso presso il laboratorio partecipante;
- Il valore di EC₅₀-24h su K₂Cr₂O₇, determinato secondo il metodo di calcolo in uso presso il laboratorio partecipante.

•

6.3.6 Criteri di validità dei saggi di tossicità

I saggi di tossicità con lisciviato di APAT RM015 e tossico di riferimento sono stati considerati validi se, al termine della prova, sono risultate soddisfatte le seguenti condizioni:

Sono stati considerati validi i risultati derivanti da prove che hanno soddisfatto le condizioni seguenti:

1. utilizzo, per i laboratori che hanno impiegato organismi da forme criptobiotiche, del lotto di ephippi (Daphtoxkit N. 070508);
2. un'immobilizzazione percentuale nei controlli, minore o uguale al 10%;
3. un valore di EC₅₀-24 h del dicromato di potassio, compresa nell'intervallo 0,6-2,1 mg/L (UNI EN ISO 6341:1999);
4. una concentrazione di ossigeno disciolto, al termine della prova, maggiore o uguale a 2 mg/L.

6.3.7 Restituzione dei risultati

I laboratori hanno riportato nella scheda dei risultati fornita dagli organizzatori i seguenti dati e informazioni:

- numero di organismi immobili rilevati nel controllo e in ognuna delle 5 diluizioni di lisciviato di APAT RM015
- valore EC₅₀-24 h (espresso in %) ottenuto nella prova definitiva con lisciviato di APAT RM015
- numero di organismi immobili rilevati nel controllo e in ognuna delle 5 diluizioni di tossico di riferimento
- valore di EC₅₀-24h (espresso in mg/L) ottenuto nella prova con il tossico di riferimento
- età e origine della coltura per i laboratori che hanno utilizzato organismi d'allevamento
- numero del lotto di ephippi per i laboratori che hanno utilizzato organismi da forme criptobiotiche
- concentrazione dell'ossigeno disciolto al termine della prova con lisciviato di APAT RM015
- misura del pH delle diluizioni di lisciviato di APAT RM015
- misura del pH dell'acqua ISO Standard (IS)
- misura della conducibilità dell'acqua pura utilizzata per la preparazione dell'acqua ISO Standard (IS).

6.4 Elaborazione statistica dei risultati

I risultati delle misure ecotossicologiche fornite dai laboratori su lisciviato di APAT RM015 e tossico di riferimento sono stati sottoposti ad una preliminare valutazione del rispetto delle condizioni di validità e dei criteri di esecuzione delle prove di tossicità acuta (24 h) con *Daphnia magna*. Sull'insieme dei dati ritenuti validi per la valutazione statistica sono stati eseguiti i test di Shapiro – Wilk e Kolmogorov-Smirnov per la verifica di "normalità" della distribuzione dei valori medi di tutti i laboratori (S.P. Millard, et al., 2001).

I valori di EC₅₀ per il lisciviato e il tossico di riferimento calcolati dai laboratori partecipanti sono stati valutati sulla base della statistica *h* e statistica *k* (ASTM E691- 1999 e ISO 5725-2, 1994).

Per le misure ecotossicologiche, le prestazioni dei laboratori sono state valutate rispetto ad un valore di riferimento assegnato per l'EC₅₀-24h di consenso. A tal fine sulla base dei dati inviati dai laboratori si è proceduto al calcolo dei singoli valori EC₅₀- 24h con un unico metodo di calcolo (Probit di Finney, valori in logaritmo base 10). Il valore di consenso è stato ottenuto quale media robusta, anti-trasformata, dei valori logaritmici di EC₅₀-24h (SOFTWARE AMC, ISO 13528:2005). Al valore assegnato sono associati un limite inferiore ed uno superiore di attenzione, pari rispettivamente al valore assegnato più o meno due volte il valore dello scarto tipo robusto ottenuto per il circuito.

6.5 Risultati

Nelle Tabelle 6.3 e 6.4 sono riassunte rispettivamente le valutazioni dei risultati delle prove ecotossicologiche eseguite su organismi da allevamento L_{AL} (26 risultati) e quelle su organismi da forme criptobiotiche L_{KIT} (22 risultati). Nella Tabella 6.3, organismi da allevamento, il "si" sta a indicare che la misura è stata effettuata e rientra nei valori stabiliti, viceversa nel caso sia riportato il "no" (misura non effettuata per indisponibilità della strumentazione, per impedimento tecnico, mancato rispetto dei parametri

etc.). Nel caso delle misure con organismi da forme criptobiotiche, Tabella 6.4, la dizione "conforme" si riferisce alle prove eseguite con il lotto di ephippi come richiesto, mentre diversamente con "non conforme" si indicano le prove che non hanno superato i criteri stabiliti come sopra elencati.

Dei 22 laboratori che hanno eseguito la prova con Daphtokit, 2 di essi (25 e 51) hanno utilizzato ephippi provenienti da lotti di produzione diversi da quello stabilito per il CI. I risultati complessivi da essi restituiti sono stati esclusi dall'elaborazione statistica, andando a costituire una fonte di variabilità non valutabile.

Per quanto riguarda le altre condizioni di validità, tutti i 48 laboratori hanno eseguito la prova con una percentuale di immobili inferiore al 10% e un valore di EC₅₀-24 h con dicromato di potassio, nell'intervallo 0,6-2,1 mg/ L. Per il valore di concentrazione dell'ossigeno disciolto 9 laboratori (5 kit e 4 allevamento, numeri 7, 9, 10, 16, 21, 24, 28, 43, 45, 52), per ragioni diverse, non hanno eseguito la misura a fine prova, con l'esclusione dall'elaborazione statistica dei risultati complessivi da loro inviati.

Con riferimento alla richiesta di test preliminari per individuare la diluizione ottimale del lisciviato RM015, 3 laboratori (9, 25 e 52) non hanno eseguito questa misura preliminare. Tra i 45 che l'hanno correttamente effettuata 10 laboratori hanno predisposto il test, con diluizioni di lisciviato a pH non idoneo per l'organismo di prova.

Per quanto concerne la preparazione dell'acqua pura IS, con riferimento ai valori fissati dalla norma, tutti i laboratori che hanno impiegato il kit hanno misurato la conducibilità dell'acqua pura, ma 5 di essi hanno riportato valori non conformi al limite stabilito.

Tabella 6.3 - Condizioni di validità e criteri d'esecuzione del saggio ecotossicologico con lisciviato di APAT RM015 (26 laboratori – allevamento)

Codice L _{AL}	Età e origine della coltura	Condizioni di validità del test			Criteri di esecuzione del saggio		
		% Imm. Controllo (≤10%)	EC ₅₀ -24 h K ₂ Cr ₂ O ₇ (0,6-2,1 mg/L)	O ₂ fine prova (≥2 mg/L)	Misura pH diluzioni di lisciviato	pH acqua IS (7,8±0,2)	Conducibilità acqua pura (max 10 µS/cm)
01	si	si	si	si	si	si	si
04	si	si	si	si	si	NA	si
06	si	si	si	si	si	si	si
12	si	si	si	si	si	si	si
13	si	si	si	si	si	si	si
14	si	si	si	si	si	si	si
19	si	si	si	si	si	si	si
20	si	si	si	si	si	si	si
21*	si	si	si	no	si	si	si
22	si	si	si	si	si	si	si
23	si	si	si	si	si	si	si
24*	si	si	si	no	si	si	si
26	si	si	si	si	si	si	si
28*	NR	si	si	no	si	si	si
31	si	si	si	si	si	si	si
33	si	si	si	si	si	si	si
34	si	si	si	si	si	si	no
35	si	si	si	si	si	si	si
43	NR	si	si	si	si	si	no
45	NR	si	si	si	si	si	no
49	si	si	si	si	si	si	si
52*	si	si	si	no	no	si	si
53	si	si	si	si	si	si	si
55	si	no	no	si	si	si	si
56	si	si	si	si	si	si	si
57	si	si	si	si	si	si	si

Abbreviazioni: NA: non adeguato; NR: non riportato

Tabella 6.4 - Condizioni di validità e criteri d'esecuzione del saggio ecotossicologico con lisciviato di APAT RM015 (22 laboratori – kit)

Codice L _{KIT}	N° lotto ephippi	Condizioni di validità del test			Criteri di esecuzione del saggio		
		% Imm. Controllo (≤10%)	EC ₅₀ -24 h K ₂ Cr ₂ O ₇ (0,6-2,1 mg/L)	O ₂ fine prova (≥2 mg/L)	Misura pH diluzioni di lisciviato	pH acqua IS (7,8±0,2)	Conducibilità acqua pura (<1 µS/cm)
02	conforme	si	si	si	si	si	si
07*	conforme	si	si	no	si	si	si
08	conforme	si	si	si	si	si	si
09*	conforme	si	si	no	no	si	si
10*	conforme	si	si	no	si	NA	NA
15	conforme	si	si	si	si	si	si
16*	conforme	si	si	no	si	NA	NA
17	conforme	si	si	si	si	si	si
18	conforme	si	si	si	si	NA	si
25	non conforme	si	si	no	no	no	no
27	conforme	si	si	si	si	si	si
29	conforme	si	si	si	si	si	si
30	conforme	si	si	si	si	si	si
37	conforme	si	si	si	si	si	si
39	conforme	si	si	si	si	si	NA
40	conforme	si	si	si	si	NA	si
44	conforme	si	si	si	si	si	NA
46	conforme	si	si	si	si	si	si
47	conforme	si	si	si	si	si	NA
48	conforme	si	si	si	si	si	si
51	non conforme	si	si	si	si	NA	si
54	conforme	si	si	si	si	si	si

Abbreviazioni: NA: non adeguato

Nel caso dei laboratori che hanno effettuato le prove con organismi di allevamento, 3 laboratori non hanno eseguito la misura richiesta, per i restanti laboratori le misure sono risultate adeguate.

Per il valore di pH dell'acqua IS (7,8 ± 0,2), 6 laboratori (5 kit e 1 allevamento) hanno riportato valori non conformi all'intervallo prestabilito. Per i 5 laboratori, poichè i sali per la preparazione dell'acqua IS sono forniti nel kit, è possibile ipotizzare che non sia stata adeguata l'acqua pura di partenza. Questa ipotesi si conferma per i laboratori 10 e 16, che riportano un valore di conducibilità dell'acqua pura (3 e 1,7 µS cm⁻¹, rispettivamente) superiore al valore, stabilito dalla norma di riferimento, di 1 µS cm⁻¹.

Nelle Tabelle 6.5 e 6.6 sono riportati in forma tabellare i valori di EC₅₀-24h (con l'intervallo di confidenza al 95%) misurati dai laboratori partecipanti e i valori di EC₅₀-24h ricalcolati da APAT con il metodo Probit Finney (1971) per i saggi con lisciviato di APAT RM015 e con tossico di riferimento, rispettivamente.

Tabella 6.5 - Misure ecotossicologiche su lisciviato di APAT RM015 espresse come EC₅₀-24 h (valori in %).

LAB	Organismo	Metodo di calcolo	Calcolato dai laboratori			Metodo Probit di Finney (1971)					
			EC ₅₀	IC95%		EC ₅₀	IC95%		Log ₁₀ EC ₅₀	IC95%	
				LL	UL		LL	UL		Log ₁₀ LL	Log ₁₀ UL
1	Allevamento	a	13,24	9,02	19,05	13,82	9,24	19,30	1,14	0,97	1,29
4	Allevamento	a	2,53	1,87	3,34	2,54	1,86	3,36	0,41	0,27	0,53
6	Allevamento	a	14,84	12,03	18,20	14,79	11,88	18,31	1,17	1,07	1,26
12	Allevamento	a	10,70	9,44	12,52	10,70	9,43	12,58	1,03	0,97	1,10
13	Allevamento	a	11,23	9,50	13,23	11,20	9,45	13,31	1,05	0,98	1,12
14	Allevamento	a	10,15	8,97	11,49	10,15	8,93	11,52	1,01	0,95	1,06
19	Allevamento	b	12,30	10,37	14,14	12,30	10,37	14,14	1,09	1,02	1,15
20	Allevamento	a	22,06	20,19	24,05	22,00	20,20	24,09	1,34	1,31	1,38
21*	Allevamento	f	6,32	NR		NA			NA		
22	Allevamento	g	60,00	51,00	70,00	58,77	51,28	65,91	1,77	1,71	1,82
23	Allevamento	b	4,26	3,30	5,34	4,26	3,30	5,34	0,63	0,52	0,73
24*	Allevamento	a	16,62	15,81	17,47	16,64	15,78	17,51	1,22	1,20	1,24
26	Allevamento	e	17,00	12,80	22,60	16,47	13,02	20,96	1,22	1,11	1,32
28*	Allevamento	a	19,31	15,14	24,45	19,32	15,10	24,50	1,29	1,18	1,39
31	Allevamento	a	6,37	5,77	6,92	6,62	5,94	7,28	0,82	0,77	0,86
33	Allevamento	a	5,99	4,90	7,38	5,99	4,89	7,39	0,78	0,69	0,87
34	Allevamento	a	16,50	12,19	21,16	15,14	12,17	21,11	1,18	1,09	1,32
35	Allevamento	a	16,57	14,81	18,35	16,56	14,75	18,39	1,22	1,17	1,26
43	Allevamento	f	15,81	NR		19,35	17,92	20,75	1,29	1,25	1,32
45	Allevamento	f	14,14	NR		12,41	10,17	15,10	1,09	1,01	1,18
49	Allevamento	a	1,21	1,01	1,44	1,18	0,98	1,43	0,07	-0,01	0,16
52*	Allevamento	a	9,83	7,94	35,94	9,99	8,17	28,26	1,00	0,91	1,45
53	Allevamento	b	4,42	3,30	5,88	4,42	3,30	5,88	0,65	0,52	0,77
56	Allevamento	b	8,07	7,23	9,31	7,72	6,81	9,25	0,89	0,83	0,97
57	Allevamento	b	27,99	21,54	34,66	27,98	21,54	34,66	1,45	1,33	1,54
2	Kit	e	12,50	NR		15,21	11,65	21,91	1,18	1,07	1,34
7*	Kit	c	14,84	8,59	25,63	9,72	5,90	18,90	0,99	0,77	1,28
8	Kit	d	25,00	NR		21,06	14,08	67,72	1,32	1,15	1,83
9*	Kit	c	7,94	6,58	9,58	7,97	6,57	9,65	0,90	0,82	0,98
10*	Kit	c	7,07	6,51	7,68	7,63	6,16	8,99	0,88	0,79	0,95
15	Kit	c	10,48	8,75	12,56	10,54	8,77	12,71	1,02	0,94	1,10
16*	Kit	c	14,94	11,44	19,50	15,68	9,57	25,05	1,14	0,98	1,40
17	Kit	d	9,14	7,21	11,60	10,45	8,67	12,75	1,02	0,94	1,11
18	Kit	e	15,00	NR		12,59	9,84	15,84	1,10	0,99	1,20
27	Kit	e	14,00	NR		13,45	9,79	16,53	1,10	0,99	1,22
29	Kit	a	9,18	7,26	11,15	9,37	7,26	11,58	0,96	0,86	1,06
30	Kit	a	27,02	22,97	33,52	27,51	23,40	33,90	1,44	1,37	1,53
37	Kit	e	3,10	NR		4,48	1,73	22,35	0,65	0,24	1,35
39	Kit	e	22,00	NR		33,31	NC		1,50		
40	Kit	b	6,32	5,16	7,71	6,32	5,16	7,71	0,80	0,71	0,89
44	Kit	a	10,33	8,23	12,39	10,33	8,23	12,39	1,01	0,92	1,09
46	Kit	c	7,80	6,29	9,67	7,91	6,31	10,02	0,90	0,80	1,00
47	Kit	a	13,56	11,92	15,90	13,55	11,87	16,06	1,13	1,07	1,21
48	Kit	a	9,47	8,16	11,39	9,47	8,15	11,40	0,98	0,91	1,06
54	Kit	b	2,01	1,39	4,17	2,01	1,39	4,17	0,30	0,14	0,62

a: Analisi dei Probit Metodo Puddu (1989), Notiz. Metodi Analit. Acque IRSA, 9 (2); b: Analisi dei Probit Metodo US-EPA (2002) Versione 1.5
c: Trimmed Spearman Karber Versione 5.1; d: Spearman (versione non indicata); e: Metodo grafico; f: Media geometrica (APAT IRSA CNR)
g: Litchfield e Wilcoxon semplificato APAT IRSA 29/2003 n. 8020 - metodo 1
(*) laboratori i cui risultati non sono stati utilizzati nel calcolo del valore di consenso
Abbreviazioni: LL: Limite Inferiore; UL: Limite Superiore; NA: non applicabile; NR: non riportato; NC: non calcolabile

Tabella 6.6 - Misure ecotossicologiche sul tossico di riferimento, dicromato di potassio, espresse come EC₅₀-24 h (valori in mg/L).

LAB	Organismo	Metodo di calcolo	Calcolato dai laboratori			Metodo Probit di Finney (1971)					
			EC ₅₀	IC95%		EC ₅₀	IC95%		Log ₁₀ EC ₅₀	IC95%	
				LL	UL		LL	UL		Log ₁₀ LL	Log ₁₀ UL
1	Allevamento	a	1,45	1,24	1,70	1,45	1,21	1,70	0,16	0,08	0,23
4	Allevamento	a	0,96	0,82	1,14	0,97	0,82	1,14	-0,01	-0,09	0,06
6	Allevamento	a	1,28	0,90	1,54	1,23	0,90	1,54	0,05	-0,05	0,19
12	Allevamento	a	0,95	0,81	1,11	0,95	0,81	1,11	-0,02	-0,09	0,05
13	Allevamento	a	1,05	0,90	1,23	1,05	0,90	1,24	0,02	-0,05	0,09
14	Allevamento	a	0,83	0,70	0,97	0,82	0,70	0,97	-0,08	-0,15	-0,01
19	Allevamento	b	1,02	0,85	1,22	0,98	0,82	1,17	0,01	-0,09	0,07
20	Allevamento	a	1,46	1,31	1,64	1,30	1,17	1,45	0,12	0,07	0,16
21*	Allevamento	f	2,40	NA		NA			NA		
22	Allevamento	g	1,08	0,75	1,50	1,14	0,97	1,35	0,06	-0,01	0,13
23	Allevamento	b	0,90	0,76	1,08	0,93	0,79	1,09	-0,03	-0,10	0,04
24*	Allevamento	a	1,17	0,97	1,41	1,16	0,95	1,40	0,08	-0,02	0,15
26	Allevamento	e	1,35	1,69	1,08	1,35	1,14	1,65	0,13	0,06	0,22
28*	Allevamento	a	1,34	1,15	1,56	1,34	1,14	1,57	0,13	0,06	0,20
31	Allevamento	a	0,98	0,84	1,13	0,95	0,81	1,12	-0,02	-0,09	0,05
33	Allevamento	a	1,22	0,97	1,56	1,18	0,94	1,50	0,07	-0,03	0,18
34	Allevamento	a	1,00	0,82	1,21	0,91	0,76	1,10	-0,04	-0,12	0,04
35	Allevamento	a	0,66	0,53	0,78	0,66	0,56	0,77	-0,18	-0,25	-0,12
43	Allevamento	f	1,00	NR		NA			NA		
45	Allevamento	f	1,00	NR		NA			NA		
49	Allevamento	a	0,99	0,84	1,17	0,92	0,78	1,08	-0,04	-0,11	0,03
52*	Allevamento	a	1,06	0,94	1,19	NA			NA		
53	Allevamento	b	1,05	0,90	1,24	1,05	0,90	1,24	0,02	-0,05	0,09
56	Allevamento	b	0,94	0,83	1,09	0,91	0,80	1,05	-0,04	-0,10	0,02
57	Allevamento	b	0,95	0,79	1,13	0,88	0,73	1,04	-0,02	-0,14	0,02
2	Kit	e	0,83	NR		0,82	0,19	4,08	-0,08	-0,72	0,61
7*	Kit	c	0,82	0,55	1,24	0,83	0,54	1,15	-0,10	-0,27	0,06
8	Kit	d	0,80	0,67	0,96	0,79	0,65	0,95	-0,14	-0,19	-0,02
9*	Kit	c	0,91	0,75	1,11	0,97	0,79	1,19	-0,01	-0,10	0,08
10*	Kit	c	1,13	0,90	1,42	1,08	0,86	1,36	0,05	-0,07	0,13
15	Kit	c	1,19	1,03	1,38	1,19	1,02	1,39	0,08	0,01	0,14
16*	Kit	c	0,77	0,65	0,91	0,78	0,65	0,92	-0,11	-0,19	-0,04
17	Kit	d	1,16	0,98	1,37	1,19	0,96	1,41	0,06	-0,02	0,15
18	Kit	e	1,05	NR		1,01	0,84	1,23	0,01	-0,08	0,09
27	Kit	e	1,00	NR		1,01	0,80	1,22	-0,04	-0,10	0,01
29	Kit	a	1,50	1,08	1,78	1,50	1,08	1,78	0,05	0,03	0,25
30	Kit	a	1,06	0,92	1,23	1,04	0,89	1,20	0,03	-0,05	0,08
37	Kit	e	0,80	NR		0,78	0,53	1,08	-0,06	-0,28	0,03
39	Kit	e	0,75	NR		0,59	0,45	0,73	-0,23	-0,34	-0,14
40	Kit	b	0,86	0,72	1,03	0,87	0,73	1,04	-0,06	-0,14	0,02
44	Kit	a	0,89	0,75	1,06	0,89	0,74	1,06	-0,05	-0,13	0,03
46	Kit	c	0,85	0,70	1,04	0,83	0,68	1,01	-0,08	-0,17	0,00
47	Kit	a	0,89	0,75	1,06	0,89	0,74	1,06	-0,05	-0,13	0,03
48	Kit	a	1,10	0,93	1,31	1,10	0,92	1,31	0,04	-0,04	0,12
54	Kit	b	1,07	0,88	1,31	1,07	0,88	1,31	0,03	-0,06	0,12

a: Analisi dei Probit Metodo Puddu (1989), Notiz. Metodi Analit. Acque IRSA, 9 (2); b: Analisi dei Probit Metodo US-EPA (2002) Versione 1.5
c: Trimmed Spearman Karber Versione 5.1; d: Spearman (versione non indicata); e: Metodo grafico; f: Media geometrica (APAT IRSA CNR)
g: Litchfield e Wilcoxon semplificato APAT IRSA 29/2003 n. 8020 - metodo 1
(*) laboratori i cui risultati non sono stati utilizzati nel calcolo del valore di consenso
Abbreviazioni: LL: Limite Inferiore; UL: Limite Superiore; NA: non applicabile; NR: non riportato; NC: non calcolabile

Nelle Tabelle 6.7 e 6.8 sono riportati il valore di riferimento assegnato per l'EC₅₀-24h di consenso (anti-logaritimo e logaritmico) con i rispettivi limiti di attenzione e lo scarto tipo del circuito per il lisciviato di APAT RM015 e il tossico di riferimento, rispettivamente.

Al calcolo del valore di consenso per il lisciviato di APAT RM015 non hanno contribuito i laboratori con codice 7, 9, 10, 16, 21, 24, 28, 43, 45, 52, i cui risultati sono stati ottenuti da misure eseguite senza che fossero completamente rispettate le condizioni di validità della prova e i criteri di esecuzione del saggio. Dal calcolo del valore di consenso sono stati esclusi anche i laboratori 25 e 51 in quanto le prove sono state eseguite su lotto di ephippi non conforme.

Tabella 6.7 - Valori assegnati di riferimento EC₅₀-24 h per il lisciviato di APAT RM015

Parametro	Valore assegnato	Limiti di attenzione		Scarto Tipo Robusto APAT IC012
		Superiore	Inferiore	
EC ₅₀ -24 h	Anti-log (%)	10,9	41,1	2,9
	Log ₁₀	1,04	1,61	0,28

Tabella 6.8 - Valori assegnati di riferimento EC₅₀-24 h per il dicromato di potassio (K₂Cr₂O₇)

Parametro	Valore assegnato	Limiti di attenzione		Scarto Tipo Robusto APAT IC012
		Superiore	Inferiore	
EC ₅₀ -24 h	Anti-log (mg/L)	0,98	1,37	1,18
	Log ₁₀	-0,0067	0,1364	-0,1497

Nelle Figure da 6.2 a 6.5 sono riportati in forma grafica i risultati dei saggi acuti con *Daphnia magna* eseguiti dai laboratori su lisciviato di APAT RM015 e sul tossico di riferimento, dicromato di potassio.

Applicando i criteri di valutazione richiamati a livello internazionale (Environment Canada), sono stati considerati "ragionevoli" i valori di scarto tipo di una serie di misure ecotossicologiche ripetute (EC₅₀ calcolati su base logaritmica) per il tossico di riferimento inferiori a 0,132. Valori inferiori 0,0338 sono, invece, stati considerati "preferibili". Rispetto a tale criterio, la serie di dati ottenuta per il lisciviato mostra una variabilità superiore con uno scarto tipo robusto su base logaritmica pari a 0,28, imputabile presumibilmente alla maggiore complessità della matrice rispetto al tossico di riferimento. Tale variabilità, se calcolata su base aritmetica, è in termini percentuali superiori al 30% (valori "ragionevoli").

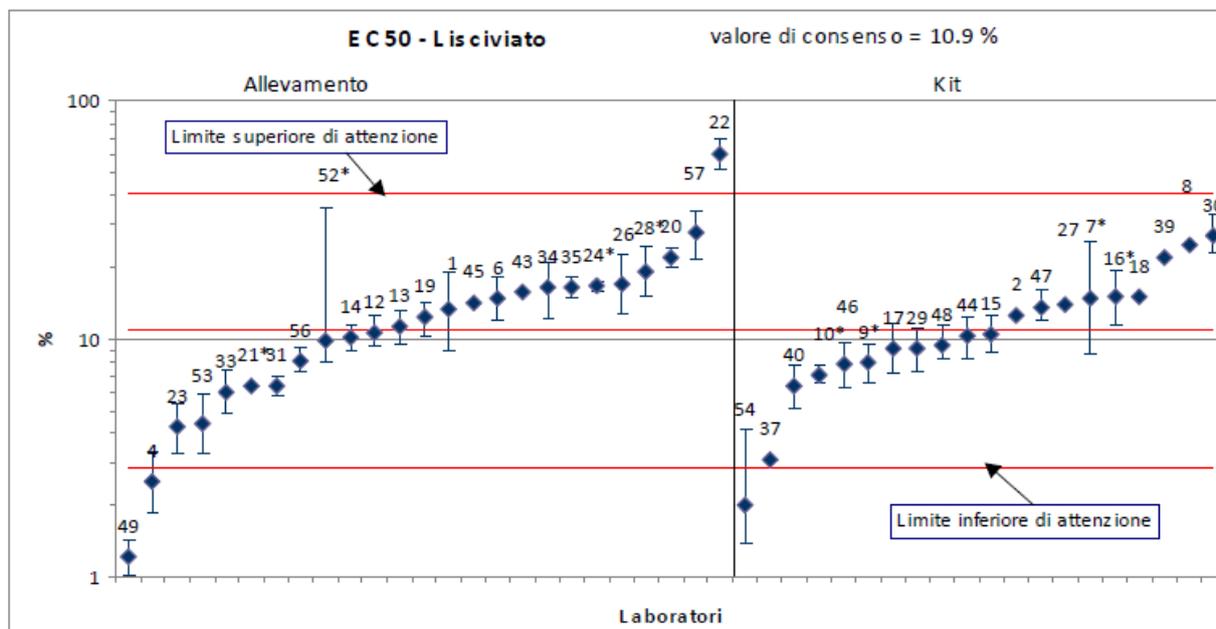


Figura 6.2 – Valori di EC₅₀-24 h con lisciviato di APAT RM015 calcolati da ciascun laboratorio partecipante (kit e allevamento) al circuito interconfronto APAT IC012. Sono riportati il valore assegnato e i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). L'asterisco "*" indica i laboratori i cui risultati non hanno contribuito al calcolo del valore assegnato.

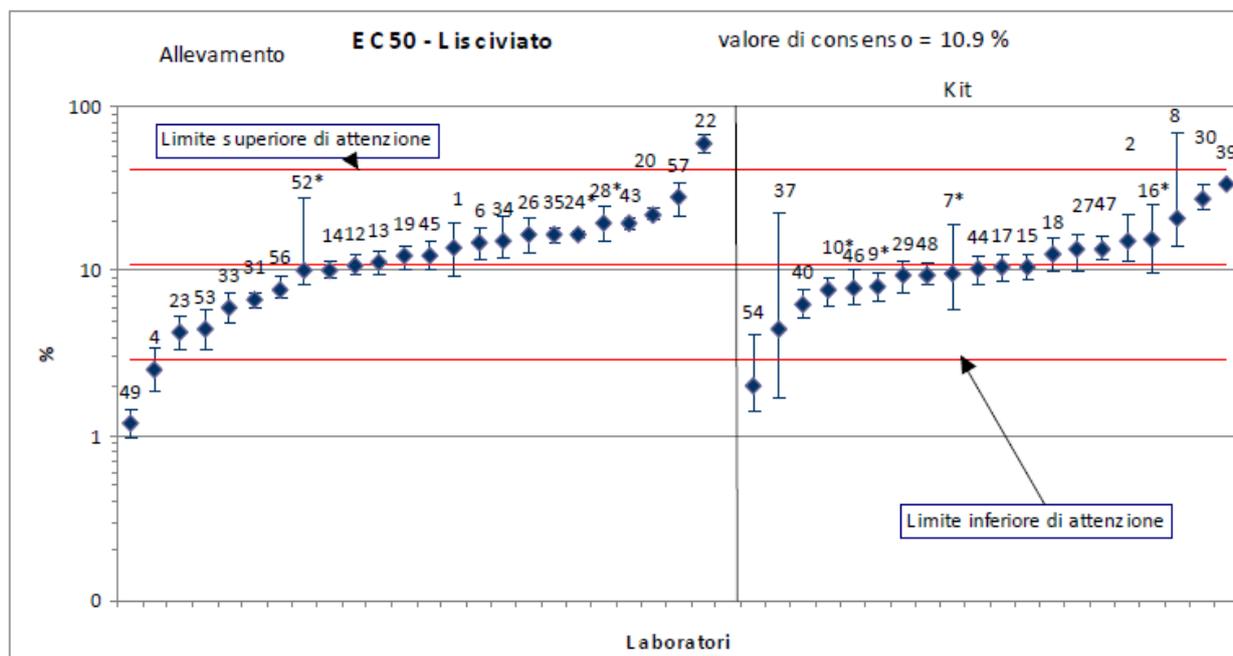


Figura 6.3 – Valori di $EC_{50-24\text{ h}}$ con lisciviato di APAT RM015 determinati da APAT con il metodo Probit Finney (1971) per ciascun laboratorio partecipante al circuito APAT IC012. Sono riportati il valore assegnato e i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). L'asterisco "*" indica i laboratori i cui risultati non hanno contribuito al calcolo del valore assegnato.

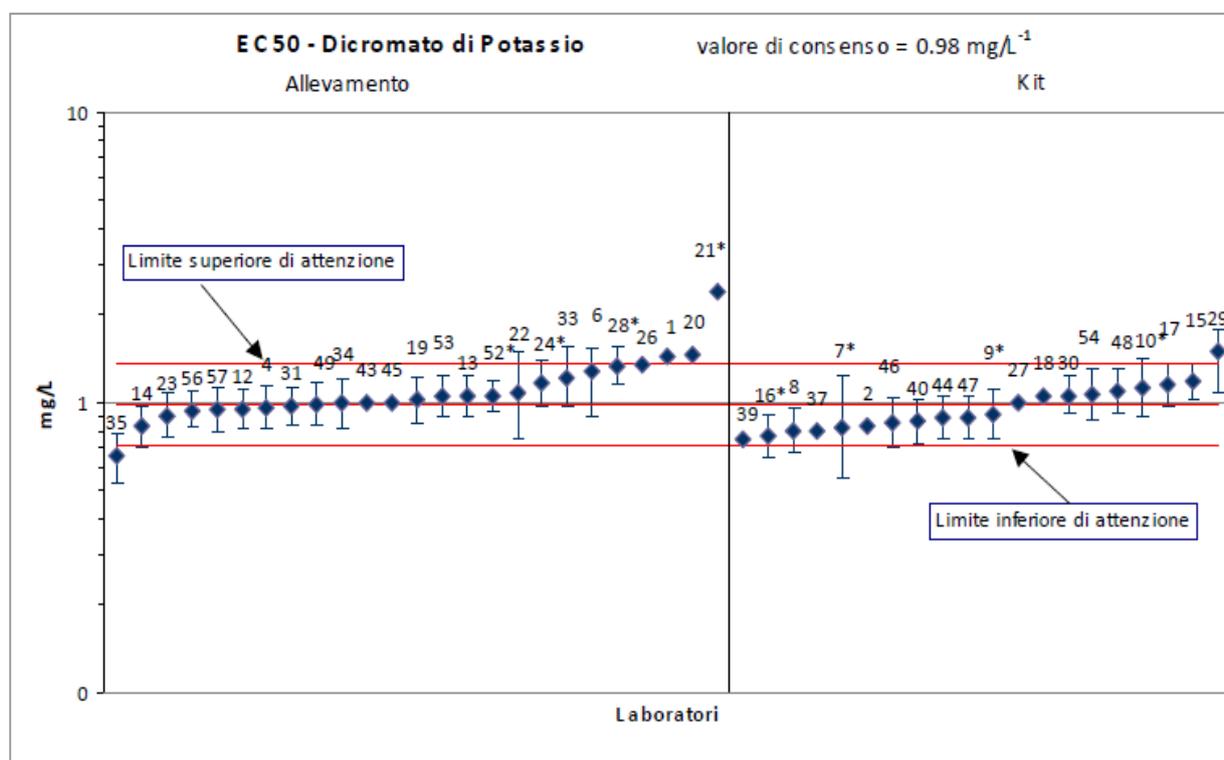


Figura 6.4 – Valori di $EC_{50-24\text{ h}}$ con dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) calcolati da ciascun laboratorio partecipante (kit e allevamento) al circuito interconfronto APAT IC012. Sono riportati il valore assegnato e i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). L'asterisco "*" indica i laboratori i cui risultati non hanno contribuito al calcolo del valore assegnato.

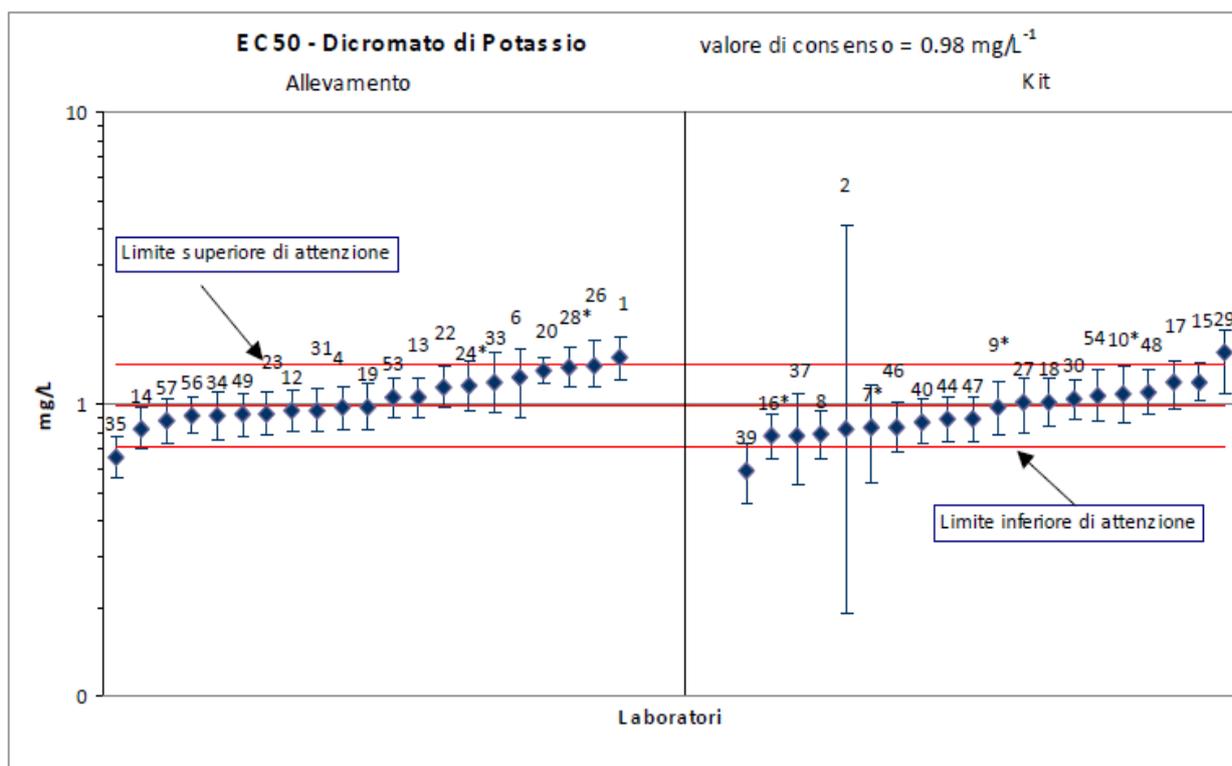


Figura 6.5 – Valori di $EC_{50-24\text{ h}}$ con dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) determinati da APAT con il metodo Probit Finney (1971) per ciascun laboratorio partecipante al circuito APAT IC012. Sono riportati il valore assegnato e i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). L'asterisco "*" indica i laboratori i cui risultati non hanno contribuito al calcolo del valore assegnato.

6.6 Conclusioni

Alcuni vincoli tecnici imposti dagli organizzatori del circuito hanno in parte condizionato l'esecuzione del test di lisciviazione secondo la norma UNI EN 12457-2, richiamata dal protocollo del circuito. In particolare sono risultati significativi:

- la quantità di materiale disponibile per la preparazione del lisciviato (20 g rispetto ai 90 g indicati dalla norma);
- la quantità della porzione di prova su cui eseguire la misura di umidità (1 g anziché 10-15 g).

L'effetto dovuto alla riduzione delle porzioni di prova rispetto alla norma (potenzialmente influente sulla rappresentatività del campione sottoposto a lisciviazione) è stato compensato, nel contesto di questo circuito, dalla ridottissima granulometria del materiale consegnato ai laboratori (< 90 micrometri) rispetto a quella normalmente riscontrata sui rifiuti (dell'ordine dei millimetri). Con riferimento alla determinazione del contenuto di umidità (ai fini di determinare il corretto rapporto liquido/solido), la norma prescrive di eseguire le prove su porzioni comprese tra 10 e 15 g. Al fine di garantire la confrontabilità dei dati, sono state eseguite prove di robustezza del metodo di misura dell'umidità su porzioni di APAT RM015 da 1 g e su porzioni da 10 g.

Relativamente alle prove ecotossicologiche sono emersi come aspetti significativi:

- un bilanciato utilizzo da parte dei laboratori di forme criptobiotiche (Daphtoxkit, Ecotox) e di organismi da allevamento;
- la complessità della matrice nel contesto delle prove ecotossicologiche;
- l'esecuzione (talvolta disattesa dai laboratori) dell'analisi preliminare di alcuni parametri (pH) prima dell'analisi definitiva.

Emerge, inoltre, una variabilità marcata delle risposte dei laboratori sul lisciviato (> 30%) per l'effetto della matrice (maggiormente complessa rispetto al sale) nonché possibili inaccuranze nell'esecuzione del metodo di misura (ad es. analisi preliminari).

6.7 Riferimenti

- APAT-IRSA-CNR, "Metodi Analitici per le Acque". Volume Terzo. 8020 Metodi di valutazione della tossicità con Daphnia. Pagg.993-1002, APAT Manuali e Linee Guida 29/2003.

-
- ASTM E691-1999 “Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method”.
 - EN 14735: 2005 Characterization of waste – Preparation of waste samples for ecotoxicity tests.
 - ISO 13528:2005 (E) “Statistical Methods for use in Proficiency testing by Interlaboratory Comparisons”.
 - ISO Guide 35:2006. “Certification of reference materials – General and statistical principles”.
 - M.H. van der Veen, T. Linsinger, J. Pauwels; “Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study”, Accreditation Quality Assurance 6, 257-263, 2001.
 - A.M.H. van der Veen, T. Linsinger, J. Pauwels; “Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study”, Accreditation Quality Assurance 6, 26-30, 2001.
 - UNI EN 12457-2: 2004 “Caratterizzazione dei rifiuti - Lisciviazione - Prova di conformità per la lisciviazione di rifiuti granulari e di fanghi - Parte 2: Prova a singolo stadio, con un rapporto liquido/solido di 10 l/kg, per materiali con particelle di dimensioni minori di 4 mm (con o senza riduzione delle dimensioni).”
 - UNI EN ISO 6341: 1999 Determinazione dell’inibizione della mobilità della Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) Prova di tossicità acuta.
 - Environment Canada EPS1/RM/46 March 2005 (with 2007 amendments) “Guidance Document on Statistical for Environmental Toxicity Tests.

7. “ISPRA-IC020” Valutazione ecotossicologica di contaminazione delle acque mediante saggi di tossicità acuta con *Vibrio fischeri*

Scopo	Il disegno sperimentale, prevede l'esecuzione per ciascun materiale, TR e ISPRA RM034, di due prove. Una prova preliminare e l'esecuzione del saggio con il batterio <i>Vibrio fischeri</i> per la valutazione dell'inibizione della bioluminescenza a tre diversi intervalli di esposizione, con determinazione dell'EC ₅₀ .
Saggio Tossico di riferimento Tossico cieco Sistema di saggio	Saggio di inibizione della bioluminescenza con <i>Vibrio fischeri</i> . Dicromato di potassio (K ₂ Cr ₂ O ₇). Cloruro di cadmio emipentaidrato, CdCl ₂ ·2,5 H ₂ O), Batteri liofilizzati e congelati, in accordo ai metodi UNI EN ISO 11348-3 e APAT-IRSA-CNR 8030.
Numero di Partecipanti	*44 ARPA/APPA
Valore di consenso	I valori di consenso sono stati ottenuti quale media robusta, anti-trasformata, dei valori logaritmici di EC ₅₀ (SOFTWARE AMC, ISO 13528:2005). Al valore assegnato di consenso sono associati un limite inferiore e uno superiore di attenzione, pari, rispettivamente, al valore assegnato più o meno due volte il valore dello scarto tipo robusto del circuito ISPRA-IC020 espressi in forma anti-trasformata dei valori logaritmici (Environment Canada, 2005).
Dettagli del saggio	Saggio con il batterio <i>Vibrio fischeri</i> per la valutazione dell'inibizione della bioluminescenza a intervalli prefissati di esposizione al tossico cieco con determinazione dell'EC ₅₀ . Il saggio è in due fasi: prova preliminare per la determinazione dell'intervallo di concentrazioni (<i>range-finding test</i>) entro il quale eseguire la prova definitiva e prova definitiva per il calcolo dei valori di EC ₅₀ . Ai partecipanti è stata lasciata la scelta sia sull'adozione del sistema di analisi per la misura dell'inibizione della bioluminescenza (Microtox o Lumistock) che sulla tipologia (acquistate o preparate in laboratorio secondo UNI EN ISO 11348-3) delle soluzioni osmotica, di riattivazione e di diluizione.

* Al circuito hanno partecipato 44 laboratori, appartenenti a 18 diverse ARPA/APPA. Di questi 42 laboratori (95%) hanno trasmesso i risultati per le misure ecotossicologiche richieste (Tabella 7.1). Di questi, 36 laboratori hanno utilizzato il sistema Microtox® (Ecotox) e 6 laboratori il sistema Lumistock® (Dr Lange). A ciascuno dei laboratori è stato assegnato un codice identificativo cui sono associati anche i risultati restituiti ed elaborati.

7.1 Materiali

Ai partecipanti sono stati distribuiti 2 materiali di prova:

- tossico di riferimento, dicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) – codificato come TR;
- tossico cieco, come materiale di riferimento, codificato come ISPRA RM034.

Il sale K₂Cr₂O₇, circa 2 g (PANREAC, CAS 7778-50-9, EINECS 231-906-6), è stato fornito ai laboratori partecipanti in provette trasparenti in PP (volume 5 mL).

Il tossico cieco preparato come materiale di riferimento e codificato come ISPRA RM034, è costituito da cloruro di cadmio emipentaidrato (CdCl₂ 2,5 H₂O). Il sale, circa 2 g (PANREAC, CAS 10108-64-2, EINECS 233-296-7), è stato fornito ai laboratori partecipanti in provette trasparenti in PP (volume 5 mL).

Entrambi i materiali di prova sono stati conservati a temperatura ambiente e al riparo dalla luce fino al momento dell'uso.

Tabella 7.1 – Laboratori ARPA/APPa (42) che hanno restituito i risultati per le misure ecotossicologiche del confronto interlaboratorio ISPRA IC020

Agenzia	Città
APPa Bolzano Laboratorio Biologico	Bolzano
ARPA Calabria Laboratorio Bionaturalistico	Catanzaro
ARPA Calabria Laboratorio Bionaturalistico	Reggio Calabria
ARPA Calabria Laboratorio Bionaturalistico	Crotone
ARPA Calabria Laboratorio Bionaturalistico	Cosenza
ARPA Campania – LMR Ecotossicologia	Napoli
ARPA Emilia Romagna	Ravenna
ARPA Emilia Romagna - Struttura Oceanografica Daphne	-
ARPA Lazio -	Latina
ARPA Liguria- Settore Biologia	Genova
ARPA Liguria - Settore Biologia	Savona
ARPA Liguria- Settore Biologia	La Spezia
ARPA Lombardia	Varese
ARPA Lombardia - Laboratorio di Ecotossicologia U.O. MESA	Cremona
ARPA Lombardia - Laboratorio di Tossicologia	Pavia
ARPA Marche - Servizio Acque	Macerata
ARPA Molise - Area Funzionale Attività Laboratoristiche – Lab Ecotossicologia	Campobasso
ARPA Molise - Area Funzionale Attività Laboratoristiche – Lab Ecotossicologia	Isernia
ARPA Piemonte VCO	Verbania
ARPA Piemonte Alessandria	Vercelli
ARPA Piemonte	Torino
ARPA Piemonte	Cuneo
ARPA Piemonte	Foggia
ARPA Puglia - Polo Specializzazione Biologia avanzata Acque	Foggia
ARPA Sicilia – Laboratorio sede centrale	Palermo
ARPA Sicilia	Catania
ARPA Sicilia	Palermo
ARPA Sardegna Dipartimento Provinciale di Servizio attività laboratoristiche	Oristano
ARPA Toscana Centro Regionale di Riferimento per le Attività Biologiche	Grosseto
ARPA Toscana	Prato
ARPA Toscana	Prato
ARPA Val d'Aosta	Aosta
ARPA Umbria – U.O.L.M. Perugia – Laboratorio Perugia	Perugia
ARPA Veneto	Vicenza
ARPA Veneto	Padova
ARPA Veneto	Treviso
ARPA Veneto	Venezia
ARPA Veneto	Verona
ARTA Abruzzo	L'Aquila
ARTA Abruzzo	Pescara
ARTA Abruzzo	Teramo
ARTA Abruzzo	Chieti

7.2 Disegno sperimentale

Materiali di partenza: un tossico di riferimento (TR) e uno cieco contenente un sale di cloruro di cadmio, ISPRA RM034, preparato dal Centro LAT.

Il disegno sperimentale, prevede l'esecuzione per ciascun materiale, TR e ISPRA RM034, di due prove. Una prova preliminare per la determinazione dell'intervallo di concentrazioni da utilizzare per l'esecuzione del saggio e l'esecuzione del saggio con il batterio *Vibrio fischeri* per la valutazione dell'inibizione della bioluminescenza a tre diversi intervalli di esposizione, con determinazione dell'EC₅₀. Nessun vincolo è stato posto sul sistema per la misura della inibizione della bioluminescenza né sulla tipologia di soluzione da utilizzare, se acquistate o preparate in laboratorio.

7.3 Saggio di inibizione della bioluminescenza con *Vibrio fischeri*

7.3.1 Principio del saggio

L'inibizione della bioluminescenza da parte di colture del batterio *Vibrio fischeri* è determinata combinando, in provetta, la sospensione batterica con specifici volumi di campione di prova. La luminescenza misurata dopo un tempo di contatto di 5, 15 e/o 30 minuti tiene conto di un fattore di correzione (f_{kt}) che misura i cambiamenti di intensità della luminescenza dei campioni di controllo durante l'esposizione.

L'effetto inibitorio del campione acquoso di prova può essere determinata come EC₂₀ e/o EC₅₀ utilizzando una serie di diluizioni.

7.3.2 Organismi

Il sistema di saggio della prova valutativa ISPRA IC020 è costituito da batteri liofilizzati e congelati, in accordo ai metodi UNI EN ISO 11348-3 e APAT-IRSA-CNR 8030. I ceppi batterici utilizzati nella prova appartengono al lotto di produzione n. 11B1034 fornito *ad hoc* dalla Ditta Ecotox S.r.l.

7.3.3 Modalità di esecuzione della prova

Esecuzione per ciascun materiale di prova (TR e ISPRA RM034) del saggio con il batterio *Vibrio fischeri*, utilizzando il lotto prefissato, per la valutazione dell'inibizione della bioluminescenza dopo 5 (solo ISPRA RM034), 15 e 30 minuti di esposizione, con determinazione dell'EC₅₀. Il saggio di inibizione con il tossico cieco ISPRA RM034 comporta due fasi: una prova preliminare per la determinazione dell'intervallo di concentrazioni- *range-finding test*- entro il quale eseguire la prova definitiva e la prova definitiva con il calcolo dei valori di EC₅₀-5, 15 e 30 minuti.

I partecipanti sono stati lasciati liberi sia di adottare il proprio sistema di analisi per la misura dell'inibizione della bioluminescenza (Microtox o Lumistock) che di utilizzare soluzioni (osmotica, di riattivazione e di diluizione) acquistate o preparate in laboratorio secondo UNI EN ISO 11348-3, con sali ad elevato grado di purezza.

I parametri richiesti, relativi alla prove definitive dei saggi di tossicità acuta con *Vibrio fischeri* sono stati i seguenti:

- valore di EC₅₀-15 e 30 minuti con il tossico di riferimento, dicromato di potassio, espresso in mg/L di Cr VI, determinato secondo il metodo di calcolo in uso presso il laboratorio partecipante;
- valore di EC₅₀-5, 15 e 30 minuti con il tossico cieco ISPRA RM034, espresso in mg/L, determinato secondo il metodo di calcolo in uso presso il laboratorio partecipante.

7.3.4 Criteri di validità dei saggi

I saggi di inibizione della bioluminescenza con tossico di riferimento e tossico cieco previsti dal confronto interlaboratorio ISPRA-IC020, sono stati considerati validi se, al termine della prova, sono risultate soddisfatte le seguenti condizioni:

- 1) EC₅₀-30 min. per il TR pari a $18,71 \pm 6,17$ mg/L di Cr VI
- 2) f_{kt} dopo 15 e 30 minuti di esposizione compreso nell'intervallo 0,6 – 1,8

Il mancato rispetto di tali criteri, o la mancata restituzione di tali informazioni, è motivo di esclusione dei risultati del laboratorio dalle valutazioni statistiche.

7.4 Elaborazione statistica dei risultati

I risultati delle misure ecotossicologiche sui composti tossici di prova sono stati sottoposti a una preliminare valutazione circa il rispetto delle condizioni di validità delle prove di tossicità con *Vibrio fischeri*.

Sull'insieme dei dati ritenuti validi per la valutazione statistica sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov per la verifica di "normalità" della distribuzione dei valori medi di tutti i laboratori (S.P. Millard, et al., 2001).

Le prestazioni dei laboratori sono state valutate rispetto ad un valore di riferimento assegnato per l'EC₅₀ di consenso sulla base dei risultati dei laboratori partecipanti. In particolare, sono stati determinati i valori di consenso per:

- EC₅₀-15 e 30 minuti, per il tossico di riferimento;
- EC₅₀- 5, 15 e 30 minuti, per il tossico cieco

Tutti i valori di EC₅₀, inviati dai laboratori, sono stati trasformati in logaritmo base 10. I valori di consenso sono stati ottenuti quale media robusta, anti-trasformata, dei valori logaritmici di EC₅₀ (SOFTWARE AMC, ISO 13528:2005).

Al valore assegnato di consenso sono associati un limite inferiore e uno superiore di attenzione, pari, rispettivamente, al valore assegnato più o meno due volte il valore dello scarto tipo robusto del circuito ISPRA-IC020 espressi in forma anti-trasformata dei valori logaritmici (Environment Canada, 2005).

7.5 Risultati

Nella Tabella 7.2 sono riassunte le risposte dei 42 laboratori (36 Microtox® e 6 Lumistock®) che hanno inviato i risultati delle prove ecotossicologiche, al fine di evidenziare il rispetto o meno delle condizioni di validità del saggio di tossicità acuta con *Vibrio fischeri*, così come richiesto dal protocollo del circuito.

Tabella 7.2 - Condizioni di validità delle prove di tossicità acuta con *Vibrio fischeri* e soluzioni di saggio

LAB	Sistema di analisi	Lotto batteri	Tossico di riferimento	Tossico cieco		Soluzioni		
			EC ₅₀ -30 min (18,71±6,17 mg/L Cr VI)	Test preliminare	f _{kt} 15/30 min (0,6 - 1,8)	Diluyente	Riattivazione	Osmotica
1	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
2	L	C	SI	SI	SI	P	P	P
3	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
4	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
5	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
6	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
7	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
8	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
9	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
10	M	C	NO	NO	SI	A	A	A
11	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
12	M	C	NO	SI	SI	A	A	A
13	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
14	M	C	SI	SI	SI	P	A	A
15	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
16	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
17	L	C	SI	SI	SI	P	P	P
18	L	C	SI	NO	SI	P	P	P
19	M	C	SI	SI	SI	P	A	P
20	M	C	SI	SI	SI	P	P	P
21	M	C	SI	SI	SI	P	P	P
22	M	C	SI	SI	SI	P	A	P
24	M	C	SI	SI	SI	A	A	P
25	M	C	SI	SI	SI	P	A	P
26	M	C	SI	SI	SI	A	A	P
27	M	C	SI	SI	SI	P	P	P
28	L	C	SI	SI	SI	P	A	NR
29	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
30	L	C	SI	SI	SI	A	A	NR
31	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
32	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
33	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
34	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
35	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
36	M	C	SI	NR	SI	A	A	A
37	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
38	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
39	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
40	M	C	SI	SI	SI	A	A	A
42	M	C	SI	SI	SI	P	A	A
43	M	C	SI	SI	SI	P	A	P
44	L	NC TR C TC	NO	SI	SI	P	P	P

Abbreviazioni: A: acquistata; C: conforme; L: Lumistock; M: Microtox; NC: non conforme; NR: non riportato; P: preparata; TR: tossico di riferimento; TC: tossico cieco

Specificatamente:

1. Il saggio è stato considerato valido se il fattore di correzione (f_{kt}) dopo 15 e/o 30 minuti di esposizione è risultato compreso nell'intervallo 0,6 – 1,8.
2. Per il tossico di riferimento, è stato assunto come criterio di validità un valore di EC₅₀-30 min pari a 18,71± 6,17 mg/L di Cr VI;
3. E' stato considerato vincolante l'utilizzo del lotto di batteri n° 11B1034 predisposto per il confronto IC020

Nelle suddette tabelle, ove riportato “SI”, la misura rientra nei valori stabiliti, viceversa è riportato “NO”. La sigla “C” (conforme) si riferisce all’utilizzo del lotto di batteri stabilito per l’interconfronto, mentre la sigla “NC” (non conforme) si riferisce all’utilizzo di batteri di ceppo diverso. E’ riportata, inoltre, l’informazione riguardante l’acquisto e/o la preparazione in laboratorio delle soluzioni del saggio (diluyente, di riattivazione, osmotica) per evidenziare, se possibile, eventuali differenze nei risultati associate alla tipologia di soluzione. Sono stati considerati validi solo i risultati derivanti da prove che hanno soddisfatto le condizioni di validità sopra menzionate. Questi risultati sono stati presi in considerazione per il calcolo del valore di consenso. Dei 42 laboratori che hanno eseguito le misure ecotossicologiche, uno di essi (cod. 44) ha utilizzato, nella prova con il TR, un lotto di batteri differente da quello stabilito per il confronto interlaboratorio. Il risultato di questo laboratorio non è stato quindi accettato nelle elaborazioni statistiche previste dal circuito (valore di consenso), sia nel caso del tossico di riferimento che nel caso del tossico cieco. Nelle Tabelle 7.3 e 7.4 sono riportati il valore assegnato (anti-logaritmo e logaritmico) ottenuto con i rispettivi limiti di attenzione e lo scarto tipo del circuito per il tossico di riferimento e il tossico cieco.

Tabella 7.3 – Valori assegnati di riferimento EC_{50-15} e 30 minuti per il tossico, dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$)

Parametro	Valore assegnato	Limiti di attenzione		Scarto Tipo Robusto ISPRA –IC020	
		Superiore	Inferiore		
EC_{50-15} min	Anti-log (mg/L)	27,32	42,84	17,43	1,25
	Log ₁₀	1,44	1,63	1,24	0,10
EC_{50-30} min	Anti-log (mg/L)	16,28	22,67	11,70	1,18
	Log ₁₀	1,21	1,36	1,07	0,07

Tabella 7.4 – Valori assegnati di riferimento EC_{50-5} , 15 e 30 minuti per il tossico, cloruro di cadmio emipentaidrato ($CdCl_2 \cdot 2,5 H_2O$)

Parametro	Valore assegnato	Limiti di attenzione		Scarto Tipo Robusto ISPRA –IC020	
		Superiore	Inferiore		
EC_{50-5} min	Anti-log (mg/L)	78,97	191,47	32,57	1,56
	Log ₁₀	1,90	2,28	1,51	0,19
EC_{50-15} min	Anti-log (mg/L)	22,00	39,87	12,14	1,35
	Log ₁₀	1,34	1,60	1,07	0,13
EC_{50-30} min	Anti-log (mg/L)	8,60	16,16	4,58	1,37
	Log ₁₀	0,93	1,21	0,66	0,14

Nelle Figure da 7.1 a 7.5 sono riportati in forma grafica i risultati del saggio con *Vibrio fischeri* eseguito dai laboratori sul tossico di riferimento, $K_2Cr_2O_7$ e sul tossico cieco, $CdCl_2 \cdot 2,5 H_2O$ (ISPRA RM034) e suddivisi per sistema di analisi (Microtox o Lumistock).

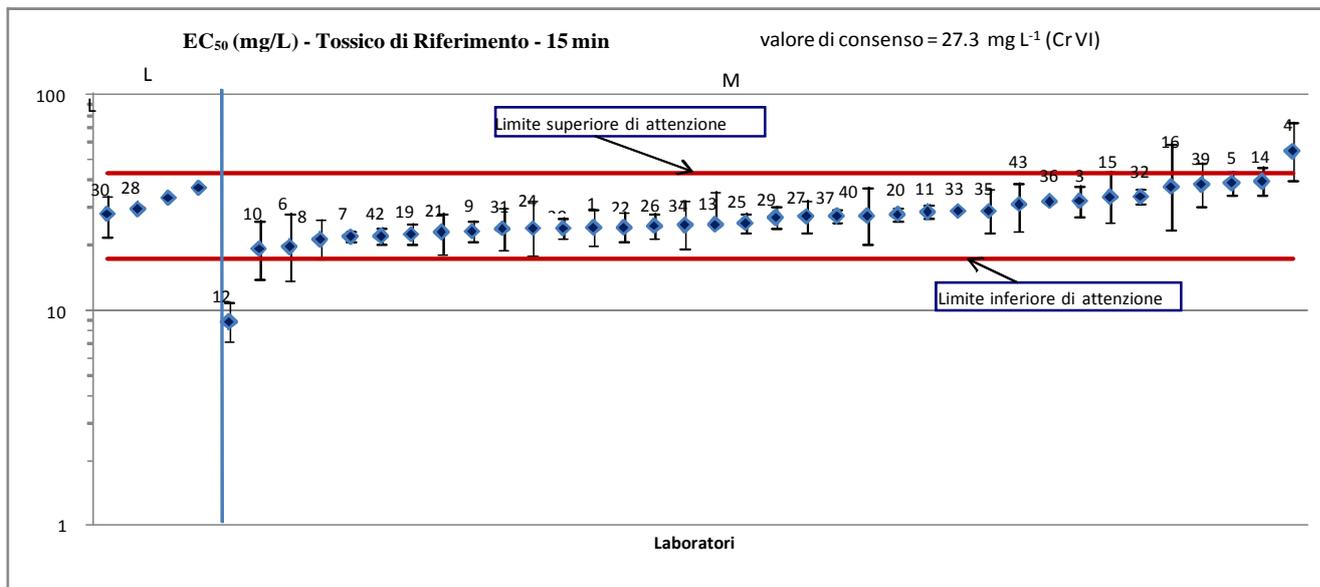


Figura 7.1 – Valori di EC_{50-15 min} ottenuti con il tossico di riferimento $K_2Cr_2O_7$. Le bande rosse rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). Abbreviazioni: L: Lumistock; M: Microtox.

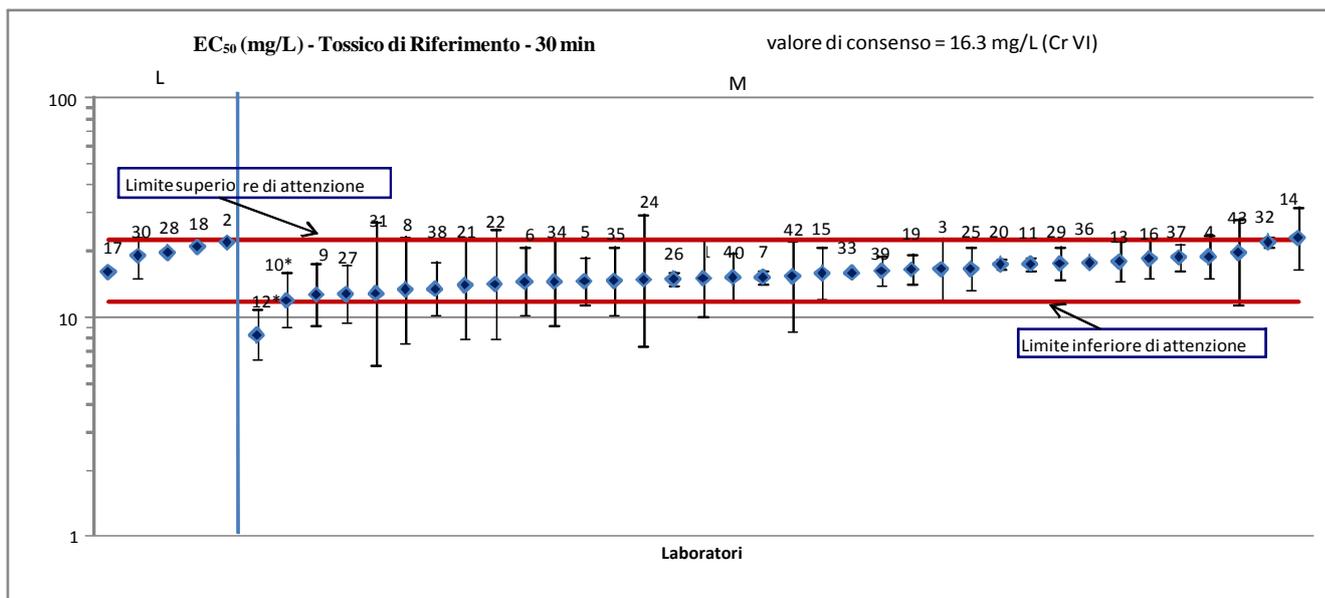


Figura 7.2 – Valori di EC_{50-30 min} ottenuti con il tossico di riferimento $K_2Cr_2O_7$. Le bande rosse rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). Abbreviazioni: L: Lumistock; M: Microtox.

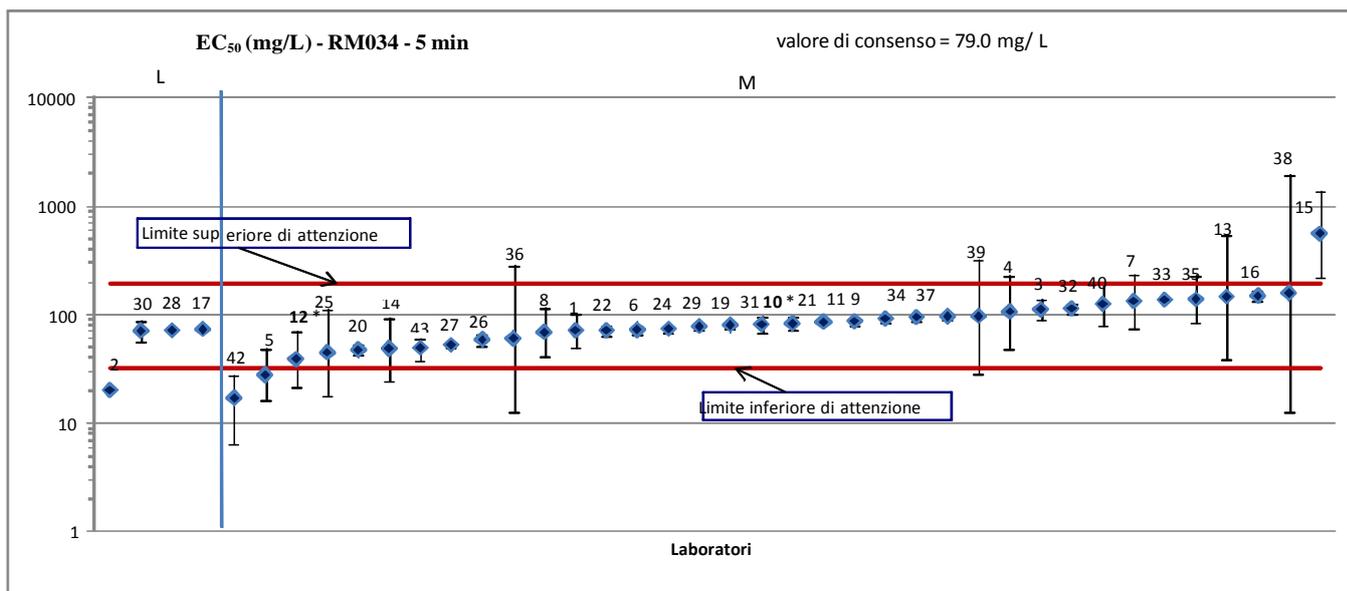


Figura 7.3 – Valori di EC₅₀-5 min ottenuti con il tossico cieco CdCl₂ · 2,5 H₂O (RM034). Le bande rosse rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). Con “*” sono indicati i laboratori i cui risultati non hanno contribuito al calcolo del valore di consenso. Abbreviazioni: L: Lumistock; M: Microtox.

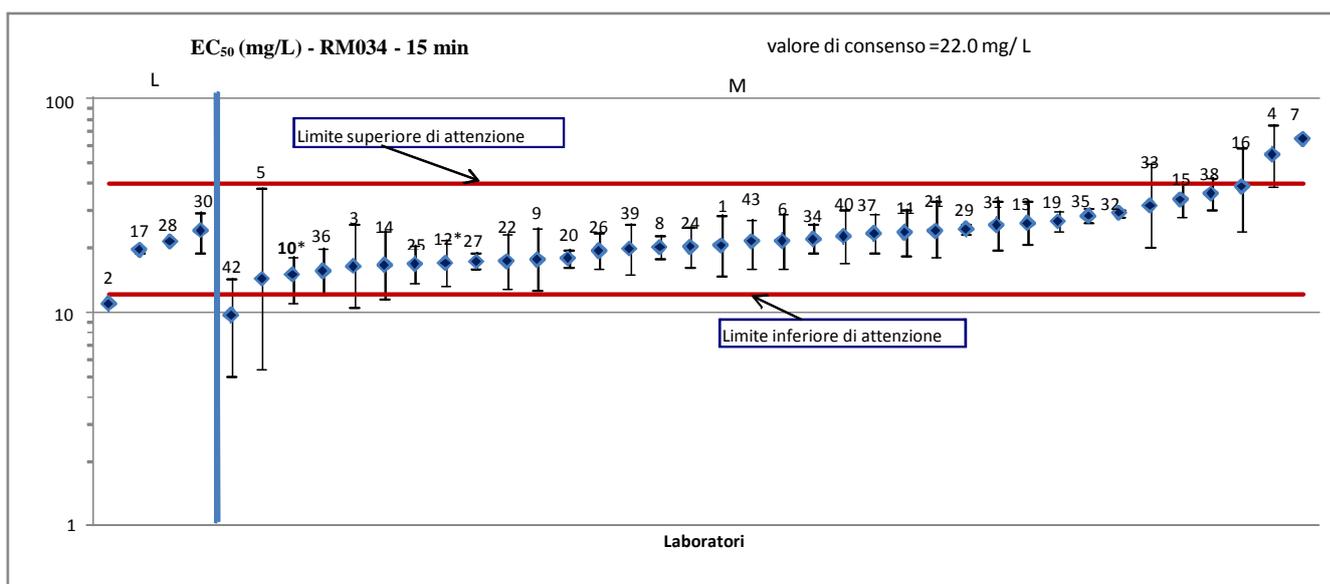


Figura 7.4 – Valori di EC₅₀-15 min ottenuti con il tossico cieco CdCl₂ · 2,5 H₂O (RM034). Le bande rosse rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). Con “*” sono indicati i laboratori i cui risultati non hanno contribuito al calcolo del valore di consenso. Abbreviazioni: L: Lumistock; M: Microtox.

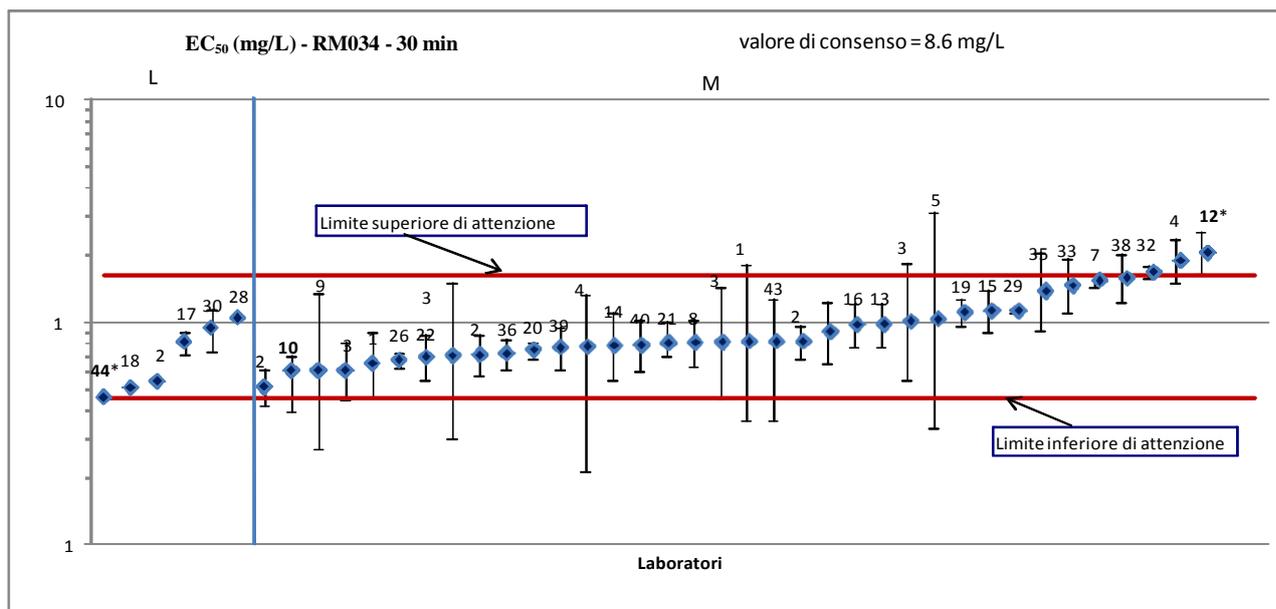


Figura 7.5 – Valori di EC₅₀-30 min ottenuti con il tossico cieco CdCl₂·2,5 H₂O (RM034). Le bande rosse rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). Con “*” sono indicati i laboratori i cui risultati non hanno contribuito al calcolo del valore di consenso. Abbreviazioni: L: Lumistock; M: Microtox.

7.6 Analisi dei risultati

Con riferimento alla Tabella 7.2, per quanto riguarda l'intervallo di EC₅₀-30 min per il dicromato di potassio, 39 laboratori hanno presentato valori entro il limite $18,71 \pm 6,17$ mg/L di Cr VI, come specificato nell'Allegato C della norma UNI EN ISO 11348-3 [4] e come previsto dal presente interconfronto. I laboratori con codice 10, 12 che non hanno rispettato suddetta condizione, sono stati esclusi dalle elaborazioni statistiche e dalla determinazione del valore di consenso per il tossico di riferimento. Tuttavia i loro risultati sono stati riportati graficamente insieme al complesso dei dati di tutti i laboratori. Tutti i 42 laboratori hanno ottenuto valori di f_{kt} a 15 e 30 min compresi nell'intervallo 0,6-1,8 come previsto dalla norma sopra citata. Erano richieste, inoltre, ai laboratori alcune informazioni sul metodo ecotossicologico e in particolare, sull'esecuzione o meno del saggio preliminare (*range-finding test*) con il tossico cieco, CdCl₂·2,5 H₂O e sull'acquisto e/o preparazione delle soluzioni osmotica, di riattivazione e diluente. Per quanto concerne il saggio preliminare, 39 laboratori hanno eseguito questa prova per la determinazione dell'intervallo di concentrazioni del tossico cieco.

In merito alle soluzioni del saggio, emerge che 40 laboratori hanno indicato la tipologia di soluzioni utilizzata Acquistata o Preparata per tutte e tre le soluzioni. Sulla base delle risposte inviate è stato possibile dividere i 40 laboratori in quattro gruppi:

- I gruppo - 25 laboratori (n° 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40): tutte e 3 le soluzioni acquistate (24/24 sistema Microtox®).
- II gruppo - 7 laboratori (n° 2, 17, 18, 20, 21, 27, 44): tutte soluzioni preparate (4 sistema Lumistock®; 3 sistema Microtox®).
- III gruppo - 4 laboratori (n° 19, 22, 25, 43): hanno acquistato solo la soluzione di riattivazione (6/6 sistema Microtox®).
- IV gruppo - 4 laboratori (n° 14, 24, 26 e 42): 2/3 soluzioni acquistate (2/2 Sistema Microtox®).

Dei 42 laboratori che hanno eseguito le misure ecotossicologiche, uno di essi ha utilizzato, nella prova con il TR, un lotto di batteri differente da quello stabilito per il confronto interlaboratorio. Poichè tale requisito costituisce uno dei criteri di validità della prova, il risultato di questo laboratorio non è stato accettato nelle elaborazioni statistiche previste dal circuito (valore di consenso), sia nel caso del tossico di riferimento che nel caso del tossico cieco.

La richiesta in merito alla provenienza delle soluzioni per l'esecuzione dei saggi ha consentito di verificare eventuali marcate differenze tra i laboratori che utilizzano soluzioni acquistate rispetto a quelli che utilizzano soluzioni preparate. Tuttavia, anche a valle di un'ulteriore richiesta di informazioni fatta da ISPRA ai laboratori una volta concluso il circuito, non è possibile giungere ad alcuna definitiva considerazione circa effetti associati alla diversa provenienza delle soluzioni. Nell'ambito del circuito ISPRA-IC020, siamo in presenza di una scarsa numerosità dei laboratori che hanno preparato tutte le soluzioni, per altro con risultati tra loro contraddittori.

La dispersione dei risultati delle misure eseguite dai laboratori per i diversi misurandi è stata espressa in termini di coefficiente di variazione percentuale (CV %), calcolato dal rapporto tra lo scarto tipo del circuito per il misurando specifico (ad esempio EC₅₀-5 min su tossico cieco) e valore assegnato, espressi in forma anti-logaritmica. Nella Figura 7.6 è riportato il grafico in cui i CV % sono posti a confronto con i valori di dispersione riportati da Environment Canada [2] come “ragionevole (30%)” e “preferibile” (20%). Benchè tali valori non possano essere considerati universalmente validi per ogni tipologia di saggio di tossicità, possono costituire comunque un punto di riferimento per valutazioni su serie ripetute di misure ecotossicologiche.

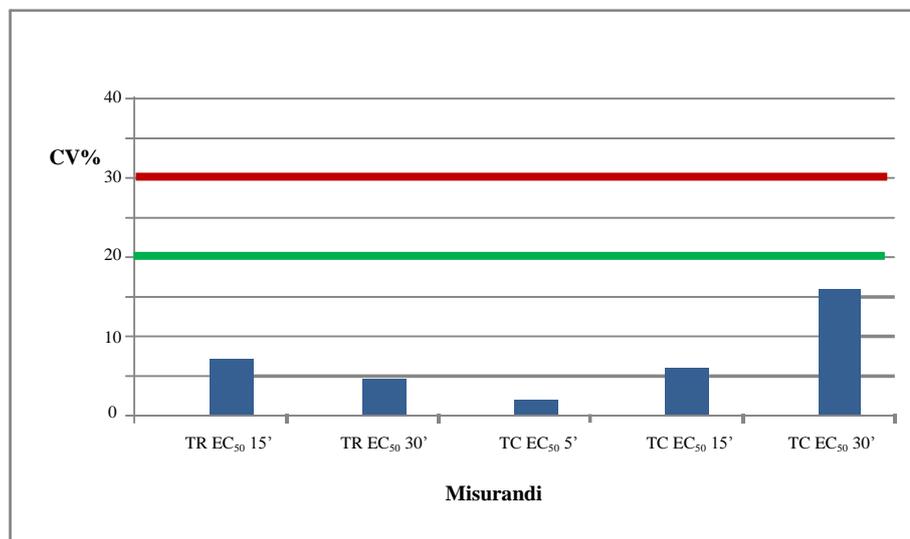


Figura 7.6– Coefficienti di variazione osservati per i diversi misurandi. Abbreviazioni: TC: tossico cieco, CdCl₂·2,5 H₂O; TR: tossico di riferimento K₂Cr₂O₇.

7.7 Conclusioni

Il confronto interlaboratorio ISPRA IC020 ha consentito di verificare il livello di dispersione tra i laboratori ARPA/APPA dei risultati delle misure dell'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal batterio *Vibrio fischeri* dopo esposizione al tossico di riferimento dicromato di potassio e ad un tossico cieco cloruro di cadmio emipentaidrato, distribuito come materiale di riferimento ISPRA RM034.

L'alta partecipazione dei laboratori al confronto, accompagnata dall'elevato rapporto tra la percentuale di restituzione dei risultati (95%) e il numero di adesioni al circuito, segnala ancora una volta la necessità avvertita dal sistema delle agenzie di prove valutative dei saggi di ecotossicità nell'ambito di un più ampio sistema di assicurazione di qualità comprendente verifiche esterne al laboratorio.

Si osserva una generale corretta applicazione del metodo di misura con la quasi totalità dei laboratori che rispettano i criteri di validità prescritti per i saggi, oggetto del circuito. La corretta applicazione dei metodi si traduce in un'ottima risposta in termini di dispersione dei risultati dei laboratori. Rispetto ai criteri raccomandati da Environment Canada, per tutti i misurandi si rilevano valori di CV % largamente inferiori al limite del 20 % indicato come “preferibile”. Il Valore massimo di CV %, pari a circa il 16 %, si rileva per la determinazione dell'EC₅₀-30 min sul tossico cieco ISPRA RM034.

I grafici dei risultati dei laboratori mostrano la maggioranza dei laboratori ricadere all'interno dei limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo del circuito) indicando ulteriormente la complessiva idoneità delle misure eseguite dai laboratori nel contesto del circuito ISPRA IC020, tanto per il tossico di riferimento quanto per il tossico cieco.

Con riferimento agli effetti potenziali indotti dall'uso o meno di soluzioni per il saggio preparate in laboratorio o reperite in commercio, i dati a disposizione non consentano alcuna considerazione conclusiva. Tale aspetto che risulta qualitativamente apprezzato da alcuni laboratori, potrebbe meritare l'esecuzione di uno specifico studio collaborativo finalizzato a verificare l'impatto della preparazione delle soluzioni sulla determinazione della tossicità di composti chimici con il batterio *Vibrio fischeri*.

7.8 Riferimenti

- ISO 13528:2005 (E) “Statistical Methods for use in Proficiency testing by Interlaboratory Comparisons”.
- Environment Canada EPS1/RM/46 March 2005 (with 2007 amendments) “Guidance Document on Statistical for Environmental Toxicity Tests.
- Steven P. Millard, Nagaraj K. Neerchal; "Environmental Statistics with S-Plus", CRC Press, USA, 2001.
- UNI EN ISO 11348-3 Determinazione dell'effetto inibitorio dei campioni acquosi all'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti). Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati.

8. ISPRA SC007 Studio collaborativo ecotossicologico su lisciviato di rifiuto mediante saggi con *pseudokirchneriella subcapitata* e *Daphnia magna*

Scopo	Definire i parametri di ripetibilità e riproducibilità della procedura di misurazione comprendente la preparazione di estratti acquosi di rifiuto (WAFs) con <i>loading rate</i> pari a 100 mg/L da un rifiuto solido
Saggio	Tossicità acuta (24 h) con organismi provenienti da forme criptobiotiche (uova durature o ehippi) e allevamento e saggio di inibizione della crescita di alghe verdi monocellulari entrambi con tossico di riferimento e WAFs.
Tossico di riferimento	dicromato di potassio (K ₂ Cr ₂ O ₇).
Materiale di prova	1 unità di ISPRA RM050- rifiuto contaminato con elevate concentrazioni di metalli in tracce.
Sistema di saggio	specie algale monocellulare d'acqua dolce <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (già <i>Selenastrum capricornutum</i>) e il crostaceo d'acqua dolce della specie <i>Daphnia magna</i> .
Numero di Partecipanti	*25 ARPA/APPA e laboratori afferenti a istituzioni pubbliche e private.
Prova	Ogni prova ripetuta cinque volte ha previsto: a) la preparazione, dal materiale ISPRA RM050, di un estratto acquoso con <i>loading rate</i> di 100 mg/L; b) l'esecuzione, sull'estratto acquoso, di un saggio con la specie algale <i>P. subcapitata</i> per la determinazione dell'inibizione di crescita (Ir %) dopo 72±2 ore e di un saggio con il crostaceo <i>D. magna</i> per la determinazione della percentuale di immobili/morti dopo 24 e 48 ore.
Dettagli dello studio	Per l'esecuzione è stato predisposto uno specifico protocollo con allegate tre procedure relative a: i) preparazione degli estratti acquosi per l'esecuzione dei saggi biologici con organismi acquatici, ii) saggio di inibizione della crescita di alghe verdi monocellulari e iii) saggio acuto con il crostaceo <i>Daphnia magna</i> . Lo studiosi è svolto tra giugno e settembre del 2014.

* Allo studio hanno partecipato 25 laboratori: 22 laboratori ARPA/APPA (individuati dall'organizzatore dello studio collaborativo e dalla Rete dei Referenti ARPA/APPA a supporto dell'organizzazione dei confronti interlaboratorio) e 3 laboratori privati, tutti esperti nella esecuzione di saggi ecotossicologici con *P. subcapitata* e *D. magna*. Ventitrè (23/25) laboratori hanno restituito i risultati (tabella 8.1).

8.1 Materiali

Per ottemperare ai requisiti della metodologia ADR/CLP per i rifiuti, due aspetti sono stati presi in considerazione.

La determinazione della quantità di campione minimo da prelevare al fine di poter garantire la sua rappresentatività, mediante l'applicazione dell'equazione di Gy (1). Questa mette in relazione la massa di un (sotto)campione e la variabilità (espressa come coefficiente di variazione, CV) associata al sottocampionamento:

$$(1) \quad m = \frac{1}{6} \pi \cdot d^3 \cdot s \cdot \rho_d \cdot g \cdot \frac{(1-p)}{(CV)^2 \cdot p}$$

L'equazione di Gy, prendendo in considerazione la forma delle particelle (s), la densità media (ρ), il fattore di correzione rispetto alla distribuzione granulometrica (g) e la dimensione delle particelle, calcola il campione minimo (m) da prelevare, ad una data granulometria, affinché la sua incertezza rispetto alla rappresentatività, si mantenga entro un dato limite di variabilità (CV). Sulla base di alcune prove di simulazione, è stato da noi ritenuto accettabile un valore di CV pari al 20%. I valori degli altri parametri impostati nell'equazione di Gy sono:

forma
densità

$$s = 0,5$$

$$\rho = 1,5$$

distribuzione granulometrica ampia $g = 0,5$
elevata eterogeneità $p = 0,001$

E' stato valutato che, con una riduzione granulometrica a 250 μm , il campione minimo da utilizzare è di 80 mg. Al di sotto di questo valore, o si passa ad una riduzione ulteriore della granulometria (per es. 125 μm) oppure diventa necessario aumentare i volumi di lisciviante.

Poiché i metodi di riferimento (Regolamento CE/440/2008) dei saggi ecotossicologici prevedono la possibilità di effettuare un test limite a 100 mg/L e questo valore rappresenta il limite della categoria "cronico 3" del CLP da applicare ai rifiuti, è stata analizzata l'applicazione di un test limite a 100 mg/L come screening preliminare di tossicità. Questo, allo scopo di limitare quanto più possibile l'esecuzione dei saggi definitivi che richiedono il calcolo del valore di LC/EC/ErC₅₀. Infatti, se i test limite risultano negativi il rifiuto può immediatamente essere classificato come non ecotossico (Conti et al., 2012).

Gli aspetti sopra menzionati sono stati oggetto di uno studio di fattibilità, eseguito presso i laboratori dell'ex Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA, su un'ampia gamma di rifiuti (2012-2013).

Ai laboratori è stata distribuita 1 unità di materiale di prova prodotto dall'ex Servizio Metrologia Ambientale - ISPRA, denominato ISPRA RM050.

ISPRA RM050 è costituito da un rifiuto (suolo contaminato) contenente elevate concentrazioni di elementi in tracce (metalli), proveniente da un'area industriale del Centro Italia.

Il materiale presenta una granulometria $\leq 250 \mu\text{m}$ (distribuzione cumulativa $> 95\%$). La granulometria è stata verificata mediante granulometro laser Helos Laser Particle Size Analyser (Sympattech). Il materiale è stato quindi omogeneizzato mediante agitazione.

Il materiale è stato confezionato in contenitori di polietilene da 50 mL con tappo a vite. Ogni unità contiene circa 2 g di materiale. Sono state condotte prove finalizzate a valutare il grado di omogeneità delle unità prodotte.

8.1.1 Prove di omogeneità del materiale di riferimento RM050

In accordo alle procedure in uso presso il Servizio di Metrologia Ambientale, lo studio di omogeneità è stato effettuato selezionando 10 unità di materiale di prova su ognuna delle quali sono state eseguite tre misure indipendenti riguardanti il contenuto di Carbonio totale (C) e di Azoto totale (N) mediante analizzatore elementare CHNS-O.

Il campione di dati ottenuti è stato sottoposto ad Analisi della Varianza (ANOVA) al fine di valutare la presenza o meno di differenze statisticamente significative tra le unità (10). Il test è risultato non significativo (livello di significatività del 95%), pertanto le unità poste tra loro a confronto provengono dalla stessa popolazione statistica e dunque il materiale è risultato omogeneo ed idoneo allo scopo dello studio collaborativo ISPRA SC007.

Tabella 8.1– Laboratori ARPA/APPa e laboratori di altre Istituzioni che hanno restituito i risultati dello studio collaborativo ISPRA SC007.

Ente

APPa BOLZANO - Lab. Biologico Prov.le
ARPA CAMPANIA - Dipartimento Provinciale di Napoli - Area Analitica
ARPA EMR Sez. Prov. Ferrara S.O. Area Ecotossicologia/Microbiologia Lab. Integrato
ARPA EMR - Sezione. Provinciale Ravenna
ARPA FVG - Laboratorio di Udine
ARPA LAZIO - Unità Risorse Idriche
ARPA LOMBARDIA U.O. Lab. Milano - Sede Lab. Parabiago
ARPA LOMBARDIA U.O. LAB. Brescia
ARPAM Servizio Acque - U.O. Ecotossicologia
ARPA PIEMONTE - Laboratorio Ecotossicologia - Dipartimento di Cuneo
ARPA PIEMONTE - SS06-05
ARPA PIEMONTE - Dipartimento di Vercelli, Laboratorio Biologico
ARPA PUGLIA - DAP Bari
ARPA PUGLIA - Dipartimento Provinciale Foggia U.O. Biotossicologia
ARPAS - Dipartimento Provinciale di Oristano - Lab. Dip.
ARPAT - UO Biologia - Area Vasta Costa
ARPA UMBRIA - UOLM / Sez. Ecotossicologia
ARPAV - DRL Laboratorio Venezia
ARTA ABRUZZO - Distretto Provinciale Pescara Biologia e Tossicologia Ambientale
ARTA ABRUZZO - Distretto Provinciale L'Aquila Lab. Biologia e Tossicologia Ambientale
CADA. snc di F. Giglio & C.
CHELAB srl - GxP Business Unit
ECOBIOQUAL srl

8.2 Disegno sperimentale

8.2.1 Sistemi di saggio

Per il test algale, il sistema di saggio era costituito dalla specie algale monocellulare d'acqua dolce: *Pseudokirchneriella subcapitata* (già *Selenastrum capricornutum*). I laboratori sono stati lasciati liberi di scegliere se utilizzare per la prova colture algali di *P. subcapitata* presenti nel proprio laboratorio o le microalghe di *P. subcapitata* immobilizzate in matrice (alginated beads).

Per il test con il crostaceo *D. magna*, il sistema di saggio è costituito da neonati di *D. magna* Straus nati da meno di 24 ore. I laboratori sono stati lasciati liberi di scegliere se utilizzare per la prova organismi provenienti da allevamenti presenti nel proprio laboratorio o derivanti da forme criptobiotiche (ephippi).

8.2.2 Disegno sperimentale

Il disegno sperimentale dello studio ha previsto la distribuzione ad ogni laboratorio partecipante di 1 unità di materiale di prova solido, denominato ISPRA RM050, prodotto da ISPRA (Servizio Metrologia Ambientale) e contenente circa 2 g di materiale.

I laboratori hanno dovuto condurre le prove seguendo in modo rigoroso tutte le fasi delle procedure di misurazione come dettagliate nel Protocollo dello studio che era stato fornito.

Ogni laboratorio ha eseguito la prova per cinque volte. Ogni prova ha previsto:

- c) la preparazione, dal materiale ISPRA RM050, di un estratto acquoso con loading rate di 100 mg/L;
- d) l'esecuzione, sull'estratto acquoso, di un saggio con la specie algale *P. subcapitata* per la determinazione dell'inibizione di crescita (Ir %) dopo 72±2 ore e di un saggio con il crostaceo *D. magna* per la determinazione della percentuale di immobili/morti dopo 24 e 48 ore.

Nella Figura 8.1 è riportato un diagramma di flusso esemplificativo della procedura oggetto dello studio collaborativo.

Almeno un test con un tossico di riferimento a scelta dei laboratori doveva essere eseguito con entrambi i sistemi di saggio per valutarne la sensibilità.

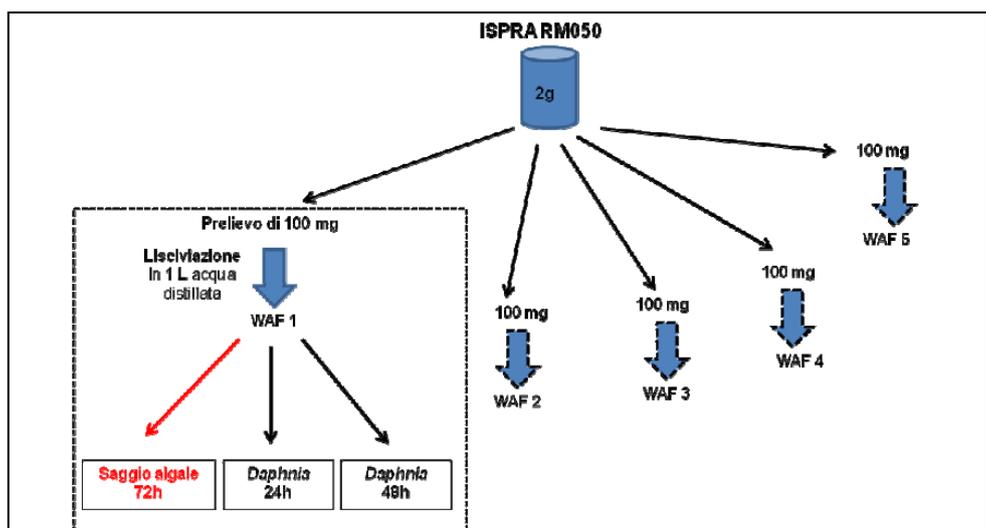


Figura 8.1 – Schema sperimentale dello studio collaborativo ISPRA SC007

8.2.3 -Preparazione degli estratti acquosi (WAFs) dal materiale di riferimento ISPRA RM050

Ogni laboratorio ha preparato 5 estratti acquosi indipendenti, seguendo dettagliatamente la seguente procedura, vedi Figura 8.2:

Preparazione dell'estratto acquoso di ISPRA RM050

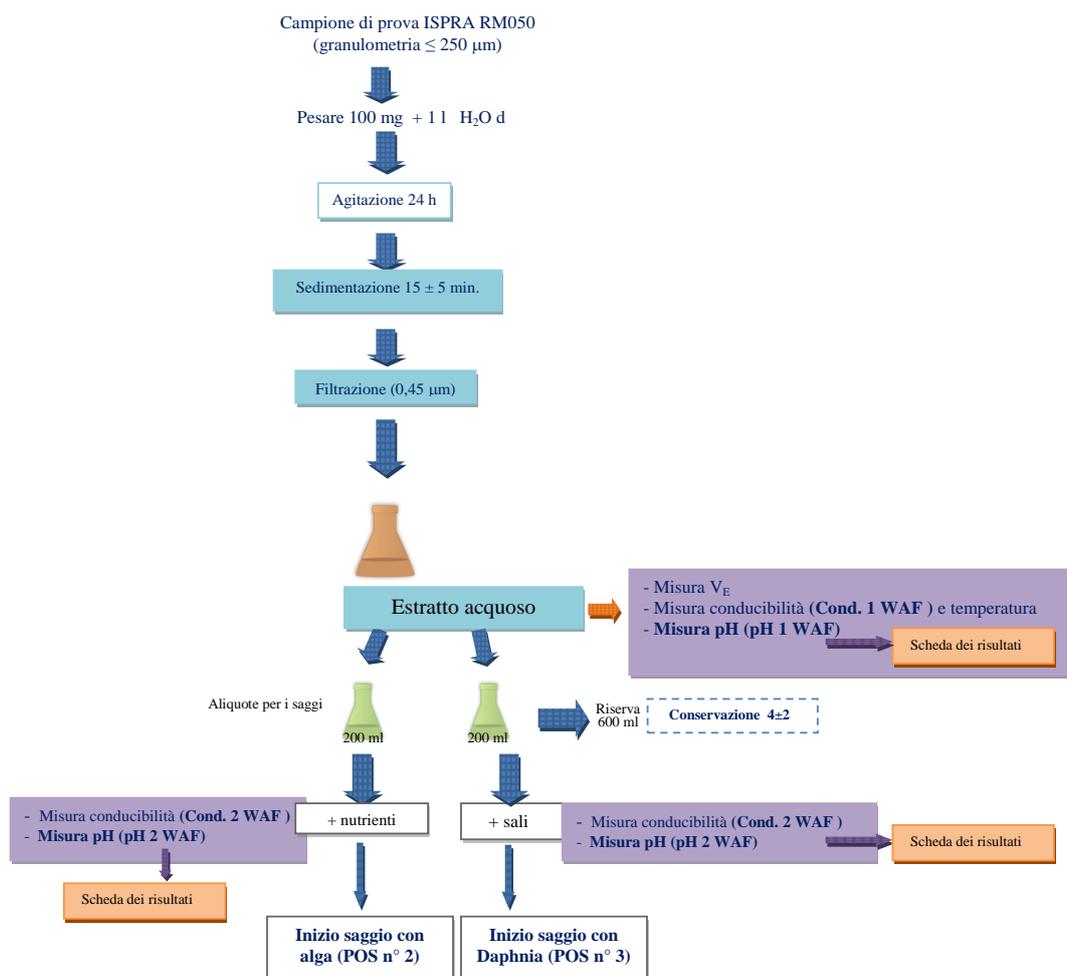


Figura 8.2– Schema sperimentale della preparazione dell'estratto acquoso(WAFs)

- Pesare una porzione di prova corrispondente a 100 ± 2 mg dal campione ISPRA RM050.
- Porre la porzione di prova in 1 litro di agente lisciviante, utilizzando bottiglie in vetro o in polietilene ad alta densità (HDPE) o in polipropilene (PP) secondo EN ISO 5667-3 fornite di tappo di materiale inerte.
- Sottoporre ad agitazione (5-10 rpm) per un periodo di $24 \pm 0,5$ ore, a temperatura compresa tra 15 e 25°C.
- Far sedimentare su un piano orizzontale per almeno 15 ± 5 minuti.
- Filtrare su membrana $0,45\mu\text{m}$ (filtri in PTFE o nylon).

L'estratto acquoso così prodotto è stato caratterizzato, determinandone il volume in ml (V_e), la temperatura (°C), il pH (pH1WAF) e la conduttività in $\mu\text{S/cm}$ (Cond. 1WAF).

Due aliquote di ogni WAF, ciascuna di 200 ml, sono state designate per l'esecuzione dei saggi e utilizzate per questo scopo entro 72 ± 2 ore dalla preparazione.

8.2.4– Saggio di inibizione di crescita di alghe verdi monocellulari

Il saggio algale con la specie d'acqua dolce *P. subcapitata* è stato eseguito dai laboratori secondo il metodo ISO 8692:2012, anche in questo caso la procedura di esecuzione è stata fornita ai partecipanti insieme al protocollo operativo. Lo schema del saggio è riportato in Figura 8.3

Organismi di prova in fase di crescita esponenziale, alla densità iniziale massima di 10^4 cell/ml, sono stati esposti ad ogni singolo WAF per un periodo di 72 ± 2 ore. La densità cellulare di ogni replica del campione di prova e del controllo è stata misurata ogni 24 ore. La risposta dell'alga *P. subcapitata* è stata valutata come inibizione della crescita (Ir %) e misurata come riduzione del tasso di crescita rispetto al controllo.

Per il terreno di coltura delle alghe ogni laboratorio ha utilizzato 4 Stock Solution (SS) sterilizzate (Macronutrienti, Fe-EDTA, Elementi in traccia, NaHCO_3) che ha preparato secondo la procedura fornita con il protocollo, utilizzando acqua deionizzata o di purezza equivalente (conducibilità $< 10 \mu\text{S/cm}$). Un litro di terreno di coltura algale è stato preparato in acqua deionizzata con 10 ml di SS1, 1 ml di SS2, 1 ml di SS3 e 1 ml di SS4 (pH compreso tra 7,9 e 8,3).

Per l'esecuzione del saggio algale, che ha una durata complessiva di 72 ore, ogni WAF è stato utilizzato a partire dallo stesso giorno della sua preparazione.

Sull'aliquota di 200 ml di WAF destinata al saggio algale, si è proceduto alla correzione osmotica con le SS (da 1 a 4) nelle seguenti proporzioni: SS1 2 ml, SS2 0,2 ml, SS3 0,2 ml e SS4 0,2 ml. Dopo agitazione manuale è stato misurato il pH della soluzione (pH 2 WAF) per verificare la sua idoneità con la vita degli organismi (pH compreso tra 6 e 9).

Dopo aver preparato una sospensione algale in crescita esponenziale ad una densità compresa tra 10^5 e 10^6 cell/ml, un adeguato volume di questa coltura algale è stato inoculato in 6 contenitori con terreno algale (controllo) e in 3 contenitori con WAF (campione di prova) in modo da avere, in ciascun contenitore, una densità algale compresa tra 10^3 e 10^4 cell/ml. Figura 8.4

Diversamente da quanto indicato nel metodo di riferimento ISO 8692, nell'ambito dello studio ISPRA SC007 ogni laboratorio è stato lasciato libero di utilizzare contenitori di prova diversi dai matracci in vetro (ad es. fiasche per colture cellulari o piastre multi pozzetto).

Le colture algali sono quindi state incubate per un totale di 72 ± 2 ore alle seguenti condizioni:

- temperatura: 23 ± 2 °C
- intensità luminosa: 6000-10000 lux, uniforme
- agitazione continua mediante piastra agitante, piano oscillante, ecc. (in alternativa, almeno una agitazione manuale al giorno).

I laboratori hanno dovuto effettuare la misura della densità cellulare in ogni replica del controllo e del campione di prova dopo 24, 48 e 72 ore di coltura, con l'apparecchiatura abitualmente utilizzata nel proprio laboratorio (Coulter Counter, spettrofotometro o microscopio con camera di conta).

Almeno un test con un tossico di riferimento a scelta dei laboratori doveva essere eseguito per valutare la sensibilità del proprio sistema di saggio.

Ogni test algale con WAF è stato considerato valido se risultavano soddisfatte le seguenti condizioni:

- 1) Il tasso di crescita medio del controllo è, dopo 72 ore di coltura, almeno $1,4 \text{ g}^{-1}$. Questo tasso di crescita corrisponde ad un aumento della densità cellulare di 67 volte in 72 ore.
- 2) Il coefficiente di variazione del tasso di crescita nel controllo, dopo 72 ore, non è superiore al 5%.
- 3) Il pH del controllo, dopo 72 ore, non è aumentato più di 1,5 unità rispetto al valore del terreno di coltura algale all'inizio del saggio.

Al termine del test, ogni laboratorio, ha proceduto al calcolo del tasso di crescita delle 72 ore per ogni replica del controllo e per ogni replica del campione di prova, al calcolo della media dei tassi di crescita del controllo (mTC_{CON}) con lo scarto tipo (ST_{CON}) e al calcolo della media dei tassi di crescita del campione di prova (mTC_{WAF}).

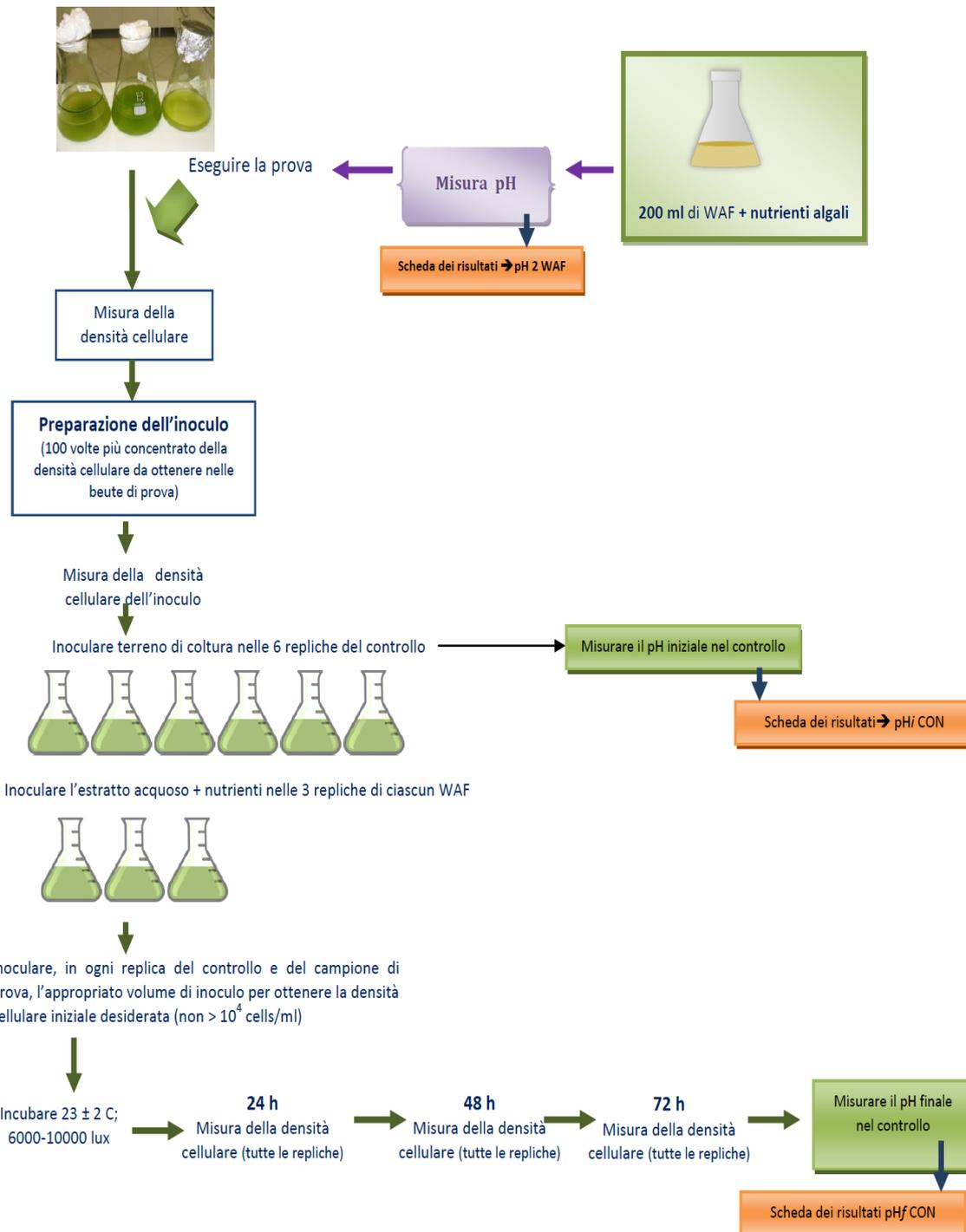


Figura 8.3 – Schema sperimentale del saggio algale

Per le prove algali con ciascun WAF, ogni laboratorio ha dovuto riportare nella scheda dei risultati le seguenti informazioni:

- La concentrazione cellulare iniziale (cells/ml)
- il valore del pH 1 WAF
- il valore del pH 2 WAF
- il valore di mTC_{CON} e ST_{CON} a 72 ore
- il valore di mTC_{WAF} a 72 ore
- il valore del pH iniziale misurato in una replica del controllo (pH_i CON)
- il valore del pH finale medio delle sei repliche del controllo (pH_f CON)
- Tipologia del sistema di saggio (ad es. allevamento o alginate beads)
- Origine e ceppo del sistema di saggio (ad es. SAG 61.81, etc.).
- Per le le “alginate beads”: provenienza, n° lotto e scadenza degli organismi.
- Sistema di misura della densità cellulare (Coulter Counter, camera di conta, spettrofotometro)
- Nome chimico del tossico di riferimento utilizzato, valore della ECr_{50} e intervallo di confidenza al 95%.

Il documento Excell fornito da ISPRA provvedeva a calcolare automaticamente i valori del tasso di crescita del controllo (CV %), dell'inibizione di crescita (Ir %) e la variazione di pH (ΔpH) come da ISO 8692:2012.

Esempio di preparazione dell'inoculo algale

Contenitori per la prova: beute in vetro da 100 ml (il volume occupato dalla sospensione algale è di 25 ml)

- 1) Dalla pre-coltura preparare un inoculo di circa 5 ml con 10^6 cell/ml. Il volume è preparato in eccesso. Una parte di questo inoculo viene utilizzata per la misura della sua densità cellulare. Con la parte rimanente verranno seminate le beute di prova.
- 2) Misurare la densità cellulare dell'inoculo mediante Coulter Counter. Supponiamo che la misura ottenuta sia di 995,000 cells/ml.
- 3) Riempire le beute di prova e del controllo come mostrato nella figura sottostante



controllo: 25 ml terreno di coltura algale



trattato: 25 ml di estratto acquoso di rifiuto

- 4) Aggiungere ad ogni beuta di prova 0,25 ml della sospensione algale dell'inoculo con densità 995,000 cell/ml ($995,000 \times 0,25 \text{ ml} = 248,750$ cellule).

$$248,750 \text{ cellule} : 25 \text{ ml} = 9950 \text{ cells/ml.}$$

9950 cells/ml costituisce la densità cellulare iniziale nominale.

Figura 8.4 – Esempio di preparazione dell'inoculo algale

8.2.5 – Saggio acuto con il crostaceo *Daphnia magna*

Il saggio acuto con il crostaceo d'acqua dolce *D. magna* è stato eseguito dai laboratori secondo il metodo UNI EN ISO 6341: 2013, le cui modalità dettagliate per l'esecuzione del saggio sono state fornite insieme al protocollo operativo.

Neonati di *Daphnia* (meno di 24 ore di età) sono stati esposti ad ogni singolo WAF con loading rate 100 mg/L per un periodo di 24 e 48 ore. La risposta del sistema di saggio è stata valutata come inibizione della mobilizzazione e misurata come percentuale di organismi immobilizzati/morti nel campione di prova (percentuale di effetto).

L'acqua di diluizione/allevamento degli organismi è stata preparata dai laboratori a partire da acqua pura con conducibilità $<10 \mu\text{S/cm}$, secondo la norma UNI EN ISO 6341, quindi conservata in frigo ($4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) fino al momento dell'uso.

Ogni WAF è stato utilizzato in modo da terminare il saggio acuto con *Daphnia* entro 72 ore dalla sua preparazione.

Sull'aliquota di 200 ml di WAF destinata al saggio con *Daphnia*, si è proceduto alla correzione osmotica con le soluzioni saline di: cloruro di calcio, solfato di magnesio, idrogeno carbonato di sodio e cloruro di potassio ed è stato misurato il pH (pH 2 WAF) e la conduttività (Cond 2 WAF) del campione.

I laboratori sono stati lasciati liberi di scegliere se preparare tali soluzioni nel proprio laboratorio utilizzando reagenti puri per analisi, o acquistarle tra quelle disponibili in commercio (ad es. come *reference standard*), indicando la scelta sul foglio di registrazione dei risultati dello studio.

Al momento dell'esecuzione del saggio, almeno 20 neonati per il controllo e 20 per l'esposizione a ciascun estratto acquoso, sono divisi in 4 repliche (5 neonati/replica) in un volume di almeno 10 ml (2 ml/organismo). Gli organismi sono stati incubati alla temperatura controllata di 20 ± 2 °C per 24 e 48 ore. Al termine di ciascuna esposizione, sono stati contati gli organismi immobili/morti in ciascuna replica del controllo e del campione di prova. Sono da considerarsi immobili gli organismi che, dopo lieve agitazione del liquido per circa 15 secondi, risultano incapaci di nuotare anche se ancora muovono le antenne.

Un test con il tossico di riferimento dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) è stato eseguito dai laboratori per valutare la sensibilità del proprio sistema di saggio.

Ogni saggio acuto con *Daphnia* è stato considerato valido se risultavano soddisfatte le seguenti condizioni:

- 1) l'immobilizzazione percentuale dei controlli $\leq 10\%$
- 2) il valore di EC_{50} -24 h del dicromato di potassio compreso nell'intervallo 0,6 – 2,1 mg/L.

Per le cinque prove, ogni laboratorio ha dovuto riportare nella scheda dei risultati le seguenti informazioni:

- valore di pH 1 WAF
- valore di Cond. 1 WAF
- valore di pH 2 WAF
- valore di Cond. 2 WAF
- n° di neonati ad inizio test per replica nel controllo e nel campione di prova
- n° organismi immobili/morti dopo 24 h per replica nel controllo e nel campione di prova
- n° organismi immobili/morti dopo 48 h per replica nel controllo e nel campione di prova
- il valore di EC_{50} -24 h (con intervallo di confidenza al 95%) per il dicromato di potassio
- tipologia di sistema di saggio (allevamento o forme cripto biotiche)
- n° lotto fiala ephippi e data di scadenza
- tipologia di soluzioni saline utilizzate (preparate o acquistate)

8.3 Elaborazione statistica dei risultati

I dati dei laboratori partecipanti allo studio sono stati sottoposti ad una accurata verifica preliminare. La verifica ha riguardato la completezza delle informazioni inviate, propedeutiche all'elaborazione statistica, e la corrispondenza tra quanto dichiarato dai laboratori, relativamente al procedimento di saggio eseguito, e quanto previsto dal protocollo dello studio. In alcuni casi si è reso necessaria una fase ulteriore di riscontro con singoli laboratori al fine di acquisire integrazioni e/o correzioni ai dati ricevuti.

I valori di ripetibilità e riproducibilità della procedura di misurazione sono stati calcolati in accordo alla norma ISO-5725-parte 2, previa applicazione dei test di Grubb e Cochran per la verifica di valori dubbi (*struggler*) e anomali (*outlier*) sia per le medie che per le varianze (intra-laboratorio). Sono stati inoltre eseguiti i test secondo la statistica *h* e *k* (Mandel), per valutare graficamente la consistenza statistica dei risultati dei laboratori (intra- e inter-laboratorio). La procedura di calcolo di ripetibilità e riproducibilità si basa su un processo iterativo che mira ad escludere dal calcolo finale degli scarti tipo di ripetibilità e riproducibilità i risultati dei laboratori che siano considerati, sulla base dei test suddetti, dubbi e/o anomali.

8.4 Risultati

Su 25 laboratori che hanno inviato la scheda di adesione allo studio collaborativo ISPRA SC007, 23 laboratori, pari al 92%, hanno restituito i risultati.

I 23 laboratori hanno preparato i 5 estratti acquosi e li hanno caratterizzati come previsto dallo studio.

Nella Tabella 8.2 sono riportate le misure di pH e conducibilità effettuate dai laboratori sugli estratti acquosi subito dopo la loro preparazione (pH 1 WAF e Con 1 WAF) e dopo la correzione osmotica (pH 2 WAF e Con 2 WAF).

I valori medi di tutte le misure effettuate ($n = 115$) dai laboratori sugli estratti acquosi (prima e dopo la correzione osmotica) e la variabilità associata, espressa come scarto tipo (ST), scarto tipo della media (STM) e coefficiente di variazione percentuale (CV%) sono mostrati nella Tabella 8.3.

La maggioranza dei laboratori (23/24) ha misurato sugli estratti acquosi appena preparati un pH acido compreso tra 3,6 e 5,03. Solo un laboratorio (lab 13) ha riportato valori differenti compresi tra 6,8 e 7,9. La maggiore variabilità riscontrata per le misure di conducibilità (CV%: 25,09 e 18,28), rispetto a quelle di pH, è probabilmente da attribuirsi all'apporto di due laboratori (lab 06 e 13) che hanno presentato valori di Cond1WAF più elevati, rispetto alla media (lab 06: 130, 125, 116, 120 e 134 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e lab 13: 139, 132 $\mu\text{S}/\text{cm}$) e valori di Cond2WAF più bassi rispetto alla media (lab 06: 262, 270, 264, 255, 277 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Escludendo, infatti queste misure, il valore del CV associato alle misure di Cond1WAF scende a 14,2% e quello del CV associato alle misure di Cond2WAF a 13,4%.

A seguito della preliminare valutazione delle risposte dei laboratori ed in accordo alle finalità dello studio, alcuni laboratori sono stati esclusi dal calcolo di ripetibilità e riproducibilità della procedura di misura. Specificatamente: i laboratori 6 e 18 per il test algale e il laboratorio 24 per il test con *D. magna*. Nell'ambito delle elaborazioni dei dati del test algale, il processo iterativo ha portato inoltre all'esclusione dalle valutazioni finali del laboratorio 23.

Complessivamente, al termine di tale processo, il numero di laboratori sui cui risultati sono stati calcolati ripetibilità e riproducibilità per il saggio algale è stato pari a 20.

Per quanto riguarda il saggio con il crostaceo *D. magna*, l'elaborazione statistica non è stata eseguita poiché i dati ottenuti sono stati tali da rendere non applicabili le procedure di calcolo della ripetibilità e della riproducibilità in accordo alla norma ISO-5725-parte 2.

Nella Tabella 8.4 sono riportate le misure effettuate dai laboratori relative al saggio algale con *Pseudokirchneriella subcapitata*. Dodici laboratori hanno effettuato il saggio utilizzando allevamenti di colture algali e 10 laboratori hanno utilizzato microalghe di *P. subcapitata* immobilizzate in matrice (alginato beads). Un laboratorio (lab 10) non ha fornito informazioni in merito al sistema di saggio utilizzato.

La quasi totalità dei laboratori (22/23) ha eseguito il test nel rispetto dei criteri di validità stabiliti dalla norma e presi in considerazione nel presente studio. I laboratori 06 e 18 che hanno riportato valori di mTC_{CON} al di sotto di $1,4 \text{ g}^{-1}$ non sono stati presi in considerazione nell'elaborazione statistica dei risultati, perché non hanno rispettato questo criterio di validità del test algale.

Tabella 8.2 – Valori di pH e conducibilità ($\mu\text{S}/\text{cm}$) misurati dai laboratori sui singoli estratti acquosi prima e dopo la correzione osmotica

Lab	WAF appena preparato		Dopo correzione osmotica		
	pH1	Cond1	Saggio algale	Saggio con <i>Daphnia</i>	
			pH2	pH2	Cond2
01	4,38	78,5	7,1	7,39	689
	4,47	76,0	7,2	7,39	700
	4,36	76,8	7,2	7,41	702
	4,39	73,0	7,3	7,41	739
	4,36	74,3	7,2	7,42	745
02	4,11	67,2	7,9	7,20	569
	4,03	69,1	8,1	7,68	562
	4,07	65,7	8,6	7,80	570
	4,08	64,9	8,7	8,45	573
	4,16	64,3	8,7	8,65	572
03	3,8	72,3	7,8	6,8	712
	3,6	73,0	7,1	6,7	680
	3,7	71,3	7,0	6,7	702
	3,7	76,1	7,0	6,8	648
	3,7	73,0	7,0	6,8	675
05	4,5	64	7,6	7,5	636
	4,5	64,2	7,6	7,5	640
	4,5	64,3	7,6	7,5	638
	4,4	63,6	7,5	7,4	636
	4,4	63,8	7,5	7,5	641

continua Tabella 8.2 – Valori di pH e conduttività ($\mu\text{S}/\text{cm}$) misurati dai laboratori sui singoli estratti acquosi prima e dopo la correzione osmotica.

WAF appena preparato			Dopo correzione osmotica		
Lab	pH1	Cond1	Saggio algale	Saggio con <i>Daphnia</i>	
			pH2	pH2	pH2
06	4,63	130	7,5	7,64	262
	4,51	125	7,6	7,59	270
	4,49	116	7,5	5,53	264
	4,42	120	7,4	7,50	255
	4,41	134	7,4	7,54	277
07	4,1	60	7,3	7,0	600
	4,2	60	7,3	7,1	600
	4,1	60	7,2	7,1	590
	4,0	60	7,1	7,1	600
	4,0	59	7,2	7,1	610
08	4,1	61,6	6,9	7,1	692
	4,1	63,6	7,2	7,1	677
	4,1	65,2	6,9	7,0	672
	4,1	68,5	7,0	7,1	681
	4,1	65,7	7,0	7,1	681
09	4,6	56,1	8,0	7,6	581
	3,8	47,5	8,1	8,0	576
	5,3	52,3	8,2	8,3	587
	3,8	49,2	7,9	8,3	597
	5,2	48,6	8,6	8,3	554
10	4,03	63	7,3	7,25	178
	3,97	63	7,2	7,22	173
	4,16	60	7,5	7,34	619
	4,03	63	7,5	7,34	569
	4,01	65	7,5	7,31	620
11	4,08	71	7,1	7,26	685
	4,08	65	7,2	7,16	688
	4,12	67	7,0	7,05	675
	3,29	68	6,9	7,14	660
	3,86	70	6,8	6,83	694
12	4,12	63,3	7,3	7,25	591
	4,08	63,7	7,3	7,27	611
	4,07	65,6	7,3	7,25	593
	4,06	66,2	7,2	7,24	597
	4,06	66,6	7,3	7,31	585
13	7,9	66	7,7	7,5	589
	7,7	68	7,7	7,4	596
	7,6	66	7,6	7,4	597
	7,5	139	6,8	6,4	709
	6,8	132	6,6	6,5	700
14	4,17	63,90	8,1	7,42	652
	4,61	74,49	8,1	7,45	656
	4,8	65,6	8,0	7,41	649
	4,21	70,36	8,0	7,39	654
	4,62	69,21	8,1	7,41	654
15	4,17	105,9	7,0	7,22	731
	4,28	69,8	7,0	7,11	720
	4,01	73,5	7,1	7,21	703
	4,22	105,4	7,2	7,26	692
	4,10	107,9	7,1	7,30	723
16	4,51	62,1	6,5	6,75	670
	4,45	61,3	6,6	6,80	676
	4,45	60,6	6,7	6,80	678
	4,50	61,0	6,8	6,90	670
	4,50	60,7	6,9	6,90	687

continua Tabella 8.2 – Valori di pH e conduttività ($\square S/cm$) misurati dai laboratori sui singoli estratti acquosi prima e dopo la correzione osmotica.

Lab	WAF appena preparato		Dopo correzione osmotica		
	pH1	Cond1	Saggio algale	Saggio con <i>Daphnia</i>	
			pH2	pH2	pH2
17	4,3	55,1	7,6	7,1	581
	4,7	61,2	7,8	7,3	787
	4,5	66,7	7,8	7,4	735
	4,7	63,7	7,6	7,7	745
	4,2	65,1	7,4	7,4	761
18	4,96	65,0	7,7	7,56	691
	4,96	67,9	7,7	7,59	697
	5,13	66,1	7,8	7,61	702
	5,79	66,9	7,9	7,76	696
	4,53	72,4	7,7	7,56	697
20	4,9	54,0	8,0	7,7	729
	4,6	60,9	7,9	7,7	716
	4,7	47,4	7,9	7,7	668
	4,4	64,0	8,0	7,6	750
	4,6	47,9	7,9	7,5	730
21	4,18	62,0	7,8	7,24	638
	4,26	58,8	7,8	7,20	640
	4,24	67,5	7,7	7,29	641
	4,30	51,4	7,9	7,36	637
	4,14	62,5	7,9	7,24	640
22	4,58	61	8,4	8,05	689
	6,20	67,3	6,5	7,12	773
	5,03	64,8	5,7	6,92	673
	4,57	66,5	5,9	6,98	643
	4,40	66,5	6,0	7,0	674
23	4,20	73,5	8,0	7,04	654
	4,22	67,3	8,1	7,06	657
	4,23	65,7	8,1	7,12	658
	4,22	69,7	8,0	7,11	659
	4,20	74,0	8,0	7,12	660
24	3,88	67,1	7,7	7,25	631
	3,78	66,1	7,7	7,27	645
	4,07	71,3	7,7	7,29	624
	3,84	64,9	7,7	7,32	647
	3,91	65,0	7,7	7,28	608
25	4,28	66	7,9	7,34	527
	4,52	66	7,3	7,43	478
	4,53	63	7,9	7,39	504
	4,69	65	8,1	7,65	565
	4,79	59	8,0	7,64	575

Abbreviazioni: ST: scarto tipo; STM: scarto tipo della media; CV: coefficiente di variabilità; WAF: Water-Accommodated fraction; Cond: conduttività.

Tabella 8.3 – Misure di pH e conduttività ($\mu S/cm$) effettuate dai laboratori sugli estratti acquosi (WAF) appena preparati e dopo correzione osmotica: valori medi e variabilità

	WAF appena preparato		Dopo correzione osmotica		
	pH1WAF	Cond1WAF	Saggio algale	Saggio con <i>Daphnia</i>	
			pH2WAF	pH2WAF	Cond2WAF
Medie	4,22	69,71	7,49	7,32	626
ST	0,32	17,49	0,54	0,39	114
STM	0,03	1,63	0,05	0,04	10,68
CV%	7,64	25,09	7,27	5,35	18,28

Abbreviazioni: ST: scarto tipo; STM: scarto tipo della media; CV: coefficiente di variabilità; WAF: Water-Accommodated fraction; Cond: conduttività.

Tabella 8.4 – Misure ecotossicologiche dei laboratori relative al saggio algale con *P. subcapitata*

Lab cod	Bott.	SS	AL origine	AB lotto	Sc. lotto	Metodo di conta	K ₂ Cr ₂ O ₇ ECr ₅₀ (IC 95%) mg/L	WAF	Conc. iniz.	Criteri di validità del test				
										mTC _{CON}	CV%	ΔpH	Ir%	
01	NR	AL	SAG 61.81 Gottingen	NA	NA	CC	1,0 (NR)	1	10870	1,728	0,78	0,85	3,2	
									9981	1,704	0,67	0,89	5,7	
									9981	1,704	0,45	0,80	4,8	
									11950	1,656	0,27	0,79	5,2	
									11950	1,656	0,67	0,74	6,2	
02	69	AL	autoctono	NA	NA	M	1,14 (1,08-1,21)	1	9977	1,457	4,05	0,51	21,1	
									9973	1,374	3,20	0,72	14,8	
									9998	1,448	4,01	0,64	11,1	
									9938	1,464	1,78	0,62	9,5	
									9966	1,445	1,59	0,74	10,7	
03	29	AL	ARPA Marche Macerata	NA	NA	CC	0,765 (0,735-0,810)	1	5433	2,204	0,74	0,29	-0,3	
									5519	2,194	0,55	0,12	-1,5	
									5519	2,194	0,55	0,12	-1,3	
									5519	2,194	0,55	0,12	-1,1	
									5519	2,194	0,55	0,12	-1,5	
05	32	AL	ATCC	NA	NA	CC	0,93 (NC)	1	10000	1,954	0,10	0,20	5,0	
									2	10000	1,954	0,10	0,20	4,8
									3	10000	1,920	1,09	0,20	5,0
									4	10000	1,996	0,20	0,30	3,7
									5	10000	1,996	0,20	0,30	2,2
06	58	AB	NA	SC130 514	30.09.20 14	SP	0,81 (0,58-1,03)	1	10000	1,230	0,41	0,10	16,3	
									2	10000	1,230	0,41	0,10	8,9
									3	10000	1,230	0,41	0,10	7,3
									4	10000	1,230	0,41	0,10	12,2
									5	10000	1,230	0,41	0,10	7,3
7	18	AL	CNR IRSA Pallanza	NR	NR	CC	0,797 (0,778-0,812)	1	19240	1,559	2,32	0,10	-2,3	
									2	19240	1,559	2,32	0,10	1,5
									3	12000	1,504	3,76	0,10	-3,3
									4	12000	1,504	3,76	0,20	-0,8
									5	10980	1,421	1,83	0,20	-0,7

continua **Tabella 8.4** – Misure ecotossicologiche dei laboratori relative al saggio algale con *P. subcapitata*

Lab cod	Bott.	SS	AL origine	AB lotto	Sc. lotto	Metodo di conta	K ₂ Cr ₂ O ₇	WAF	Conc. iniz.	Criteri di validità del test			Ir%	
							ECr ₅₀ (IC 95%) mg/L			mTCCON	CV%	ΔpH		
08	53	AL	SAG 61.81 Gottingen	NA	NA	CC	1,2	1	6790	1,795	1,97	-0,55	5,8	
							(0,8-1,6)		2	6790	1,795	1,97	-0,55	9
							3		6790	1,795	1,97	-0,55	9,3	
							4		5585	1,444	1,48	-0,471	10,2	
							5		5585	1,444	1,48	-0,471	15,6	
09	36	AB	NA	SC130 514	30.09.20 14	SP	0,89	1	6233	1,757	4,47	1,18	1,9	
							(0,62-1,18)		2	6233	1,757	4,47	1,18	11,8
							3		6233	1,757	4,47	1,18	9,0	
							4		6233	1,757	4,47	1,18	11,6	
							5		9233	1,757	4,47	1,18	6,5	
10	09	NR	NR	NR	NR	CC	0,95	1	10000	1,937	1,50	0,55	-1,3	
							(NR)		2	10000	1,937	1,50	0,58	-1,1
							3		10000	2,102	0,95	0,10	3,5	
							4		10000	2,102	0,95	0,10	0,2	
							5		10000	2,102	0,95	0,10	-2,5	
11	72	AB	NA	SC130 514	30.9.14	SP	1,02	1	4700	2,007	0,40		3,9	
							(1,01-1,03)		2	4800	2,028	0,39		5,1
							3		5000	2,008	0,40		4,0	
							4		5000	1,98	0,25		1,7	
							5		5000	1,973	0,67	1,76	4,0	
12	21	AB	NA	SC261 113	NR	CC	0,959	1	9930	1,822	2,36	1,0	10,8	
							(NR)		2	9930	1,822	2,36	0,91	9,1
							3		9930	1,822	2,20	0,79	6,7	
							4		9930	1,822	2,20	0,81	8,3	
							5		9930	1,822	2,20	1,00	4,9	
13	51	AL	da AB Ecotox	NA	NA	CC	1,224	1	7875	1,670	1,80	-0,31	1,4	
							(1,094-1,354)		2	7875	1,660	2,35	-0,22	1,3
							3		7875	1,639	0,79	0,38	0,7	
							4		6867	1,734	0,92	-0,95	5,5	
							5		6867	1,718	2,10	-0,80	4,3	
14	65	AL	CNR IRSA Brugherio	NA	NA	CC	1,132	1	10000	1,817	0,55	0,09	2,6	
							(1,123-1,140)		2	10000	1,792	1,0	0,07	3,9
							3		10000	1,832	0,93	0,10	7,1	
							4		10000	1,809	1,38	0,09	1,4	
							5		10000	1,727	1,51	0,11	2,2	
15	77	AB	NA	SC130 514	30.09.14	CC	1,31	1	9800	1,42	0,29	1,47	9,2	
							(NR)		2	9800	1,42	0,29	1,47	10,8
							3		9800	1,42	0,28	1,47	9,6	
							4		9800	1,413	0,83	1,40	12,9	
							5		9800	1,413	0,83	1,40	11,3	
16	27	AB	NA	SC130 513	30.09.14	SP	1,157	1	10976	1,426	0,77	1,45	5,3	
							(1,101-1,214)		2	10976	1,470	0,24	1,40	9,5
							3		10976	1,434	0,76	1,38	6,2	
							4		10976	1,475	0,24	1,40	7,4	
							5		10976	1,475	0,43	1,39	7,7	
17	34	AB	NA	SC280 513	31.10.20 13	CC	0,713	1	10000	1,700	1,12	1,31	8,5	
							(0,676-0,750)		2	10000	1,664	1,32	1,32	5,2
							3		10000	1,664	1,32	1,32	6,2	
							4		10000	1,601	2,44	0,68	1,4	
							5		10000	1,601	2,44	0,68	4,1	
18	15	AB	NA	SC130 514	30.09.20 14	SP	0,55	1	10000	1,361	1,47	1,1	11,9	
							(0,01-1,41)		2	10000	1,28	0,78	0,8	4,5
							3		10000	1,329	1,50	1,1	10,3	
							4		10000	1,328	2,26	1,0	6,9	
							5		10000	1,323	0,76	1,0	7,7	

continua Tabella 8.4 – Misure ecotossicologiche dei laboratori relative al saggio algale con *P. sub capitata*

Lab cod	Bott.	SS	AL origine	AB lotto	Sc. lotto	Metodo di conta	K ₂ Cr ₂ O ₇ EC ₅₀ (IC 95%) mg/L	WAF	Conc. iniz.	Criteri di validità del test			Ir%	
										mTC _{CON}	CV%	ΔpH		
20	88	AB	NA	SC130 514	30.09.'1 4	SP	0,63 (0,52-0,75)	1	8128	1,420	2,11	0,8	-4,9	
									2	8128	1,420	2,11	0,7	-1,4
									3	8128	1,420	2,11	0,6	3,5
									4	8128	1,420	2,11	0,6	5,6
									5	8128	1,420	2,11	0,7	2,8
21	25	AL	ARPA Toscana Livorno	NA	NA	M	1,4 (0,74-2,06)	1	9170	1,586	1,64	0,28	11,7	
									2	8750	1,599	1,44	0,28	13,6
									3	8330	1,614	1,36	0,37	14,9
									4	8750	1,602	0,81	0,30	19,2
									5	9170	1,586	0,95	0,35	18,9
22	71	AL	CCAP 278/4	NA	NA	CC	0,62 (0,54-0,7)	1	5000	1,584	4,85	0,56	9,1	
									2	5000	1,512	2,55	0,56	10,8
									3	5000	1,512	0,00	0,56	7,9
									4	5000	1,536	0,00	0,56	7,9
									5	5000	1,512	1,27	0,56	14,3
23	07	AL	IRSA-CNR	NA	NA	SP	0,78 (0,75-0,79)	1	10000	1,880	1,06	-0,50	34,6	
									2	10000	1,880	1,06	-0,50	49,5
									3	10000	1,880	1,06	-0,50	30,9
									4	10000	1,880	1,06	-0,50	40,4
									5	10000	1,880	1,06	-0,50	28,7
24	43	AL	IRSA-SE1	NA	NA	SP	1,35 (1,32-1,38)	1	10000	1,940	0,21	1,20	1,0	
									2	10000	1,940	0,21	1,20	1,0
									3	10000	1,940	0,21	1,20	1,5
									4	10000	1,940	0,21	1,20	2,1
									5	10000	1,940	0,21	1,20	41,2
25	84	AB	NA	SC110 112	NR	M	1,05 (0,68-1,41)	1	10000	1,640	1,95	0,75	9,1	
									2	10000	1,430	2,31	-0,06	2,8
									3	10000	1,450	2,76	-0,41	6,2
									4	10000	1,960	2,81	0,38	7,7
									5	10000	1,900	2,63	0,30	5,8

Abbreviazioni: AL: allevamento; AB: alginare beads; M: microscopio con camera di conta; CC: Coulter Counter; Bott.: bottiglia; NA: non applicabile; NR: non riportato; SP: spettrofotometro; SS: sistema di saggio

Nella Figura 8.4 sono riportati graficamente i valori medi di Ir % con associato scarto tipo per ciascun laboratorio che ha rispettato i criteri di validità del saggio algale (n= 21).

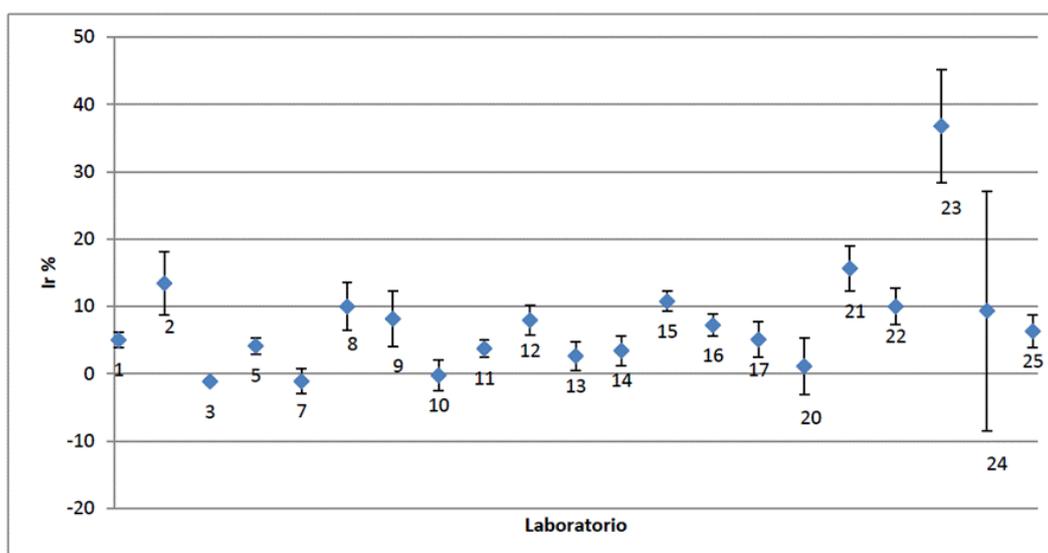


Figura 8.4 - Valori medi di Ir % con associato scarto tipo, per ciascun laboratorio che ha rispettato i criteri di validità del test algale.

Sono stati utilizzate tre metodologie di conta algale: con Coulter Counter (12 laboratori), mediante spettrofotometria (8 laboratori) e al microscopio con camera di conta (3 laboratori).

La totalità dei laboratori ha eseguito un saggio con il tossico di riferimento dicromato di potassio. Si evidenzia che solo 3 laboratori (18, 20, 22) hanno presentato valori di ECr_{50-72h} al di sotto dei limiti di riferimento indicati dalla norma ISO 8692 come dati di precisione e pari a $1,19 \pm 0,54$ mg/L (corrispondente al valore medio di $ECr_{50} \pm 2ST$ per il dicromato di potassio).

Nella Tabella 8.5 sono riportate le misure effettuate dai laboratori relative al saggio acuto con *Daphnia magna*. Tredici laboratori hanno effettuato il saggio acuto utilizzando allevamenti di *Daphnie* presenti nel proprio laboratorio, 9 laboratori hanno invece utilizzato le forme criptobiotiche dell'organismo (ephippi). Un laboratorio (lab 10) non ha fornito informazioni in merito al sistema di saggio utilizzato.

Tabella 8.5 – Misure ecotossicologiche dei laboratori relative al saggio acuto (24 h) con *Daphnia magna*

Lab cod	Bott.	SS	AL Origine e ceppo	Lotto FC	Sc. lotto	Sali (A o P)	WAF	Criteri di validità del test			effetto 24 h %	effetto 48 h %
								Con 24 h I %	Con 48 h I %	$K_2Cr_2O_7$ EC_{50} (IC 95%) mg/L		
01	NR	AL	NR	NA	NA	P	1	0	0	1,0 (0,93-1,38)	5	10
							2	0	0		5	10
							3	0	0		0	10
							4	0	0		5	10
							5	0	0		5	10
02	69	AL	NR	NA	NA	P	1	0	0	0,98 (0,86-1,1)	10	10
							2	0	0		0	0
							3	0	0		0	0
							4	0	10		0	5
							5	0	0		0	0
03	29	AL	NR	NA	NA	P	1	0	0	1,135 (0,836-1,196)	0	0
							2	0	0		0	0
							3	0	0		0	0
							4	0	0		0	0
							5	0	0		0	0
05	32	AL	proprio lab	NA	NA	P	1	0	0	1,15 (1,03-1,32)	0	5
							2	0	0		0	5
							3	0	0		0	15
							4	0	0		0	15
							5	0	0		0	10
06	58	FC	NA	DM 200314	31.10.14	A	1	0	0	0,833 (0,645-1,056)	5	5
							2	0	0		0	0
							3	0	0		0	0
							4	0	0		0	0
							5	0	0		0	0
07	18	AL	NR	NA	NA	P	1	0	0	0,797 (0,706-0,874)	10	15
							2	0	0		15	20
							3	0	0		5	15
							4	0	0		5	10
							5	0	0		5	10
08	53	AL	proprio lab	NA	NA	P	1	0	0	1,404 (1,236-1,583)	0	5
							2	0	0		0	0
							3	0	0		0	0
							4	0	0		0	0
							5	0	0		0	5
09	36	FC	NA	DM 200314	30.11.14	A	1	0	0	1,41 (1,04-1,79)	0	25
							2	0	0		5	35
							3	0	0		0	35
							4	0	0		0	10
							5	0	0		0	10
10	09	NR	NR	NR	NR	P	1	0	0	0,90 (0,81-1,0)	5	5
							2	0	0		15	15
							3	0	0		0	0
							4	0	0		0	10
							5	0	0		0	0
11	72	FC	NA	DM 191213	31.08.20 14	A	1	0	0	1,28 (1,05-1,57)	0	10
							2	0	0		0	0
							3	0	0		0	10
							4	0	0		0	0
							5	0	0		0	10

continua Tabella 8.5 – Misure ecotossicologiche dei laboratori relative al saggio acuto (24 h) con *Daphnia magna*

Lab cod	Bott.	SS	AL Origine e ceppo	Lotto FC	Sc. lotto	Sali (A o P)	WAF	Criteri di validità del test			effetto 24 h %	effetto 48 h %
								Con 24 h I %	Con 48 h I %	K ₂ Cr ₂ O ₇ EC ₅₀ (IC 95%) mg/L		
12	21	FC	NA	DM 191213	30.09.14	P	1	0	0	0,81 (0,65-0,99)	0	10
							2	0	0		0	5
							3	0	0		0	15
							4	0	0		0	5
							5	0	0		5	20
13	51	AL	NR	NA	NA	P	1	0	0	0,91 (0,71-1,14)	5	30
							2	0	0		0	30
							3	0	0		5	30
							4	0	5		10	35
							5	0	5		5	35
14	65	AL	da ARPA Lombardia - pavia 7/11/14	NA	NA	P	1	0	0	1,0 (0,9-1,1)	0	5
							2	0	0		0	10
							3	0	0		0	10
							4	0	0		0	10
							5	0	0		0	15
15	77	FC	NA	DM 200314	30/09/14	A	1	0	0	0,87 (0,75-1,03)	0	7
							2	0	0		0	7
							3	0	0		0	4
							4	0	0		0	4
							5	0	0		0	7
16	27	FC	NA	DM 200314	31/12/14	P	1	0	0	1,09 (0,966-1,22)	0	25
							2	0	0		10	10
							3	0	0		10	25
							4	0	0		10	10
							5	0	0		10	10
17	34	FC	NA	DM 191213	31.07.14	P	1	0	0	0,91 (0,86-0,97)	0	5
							2	0	0		0	5
							3	0	0		0	0
							4	0	0		10	15
							5	0	0		0	5
18	15	FC	NA	DM 200314	31.11.14	A e P	1	0	0	1,52 (1,24-1,87)	0	0
							2	5	0		0	0
							3	5	5		0	0
							4	5	5		0	0
							5	0	0		0	0
20	88	FC	NA	DM 200314	31.12.14	A	1	0	5	0,87 (0,74-1,02)	0	15
							2	0	0		0	0
							3	0	0		5	5
							4	0	0		5	15
							5	0	0		0	0
21	25	AL	proprio	NA	NA	P	1	0	0	1,09 (0,97-1,24)	0	0
							2	0	0		0	0
							3	0	0		0	0
							4	0	5		0	5
							5	0	5		0	0
22	71	AL	NR	NA	NA	P	1	0	0	1,60 (1,41-1,86)	0	15
							2	0	0		0	0
							3	0	0		0	0
							4	0	0		0	0
							5	0	0		0	5
23	007	AL	NR	NA	NA	P	1	0	0	0,82 (0,68-0,96)	5	15
							2	0	0		0	10
							3	0	0		0	15
							4	0	0		5	25
							5	0	0		0	5
24	43	AL	NR	NA	NA	P	1	0	5	0,35 (0,21-0,74)	0	10
							2	0	5		5	20
							3	0	5		0	0
							4	0	5		10	10
							5	0	5		5	5
25	84	AL	NR	NA	NA	P	1	0	0	0,93 (0,76-1,14)	0	0
							2	0	0		0	0
							3	0	0		0	0
							4	0	0		0	0
							5	0	0		0	0

Abbreviazioni: A: acquistate; AL: allevamento; FC: forme criptobiotiche; NA: non applicabile; NR: non riportato; P: preparate

Nella Tabella 8.6 sono mostrati i valori medi delle percentuali di effetto a 24 e 48 ore e i relativi coefficienti di variazione (CV %).

Tabella 8.6 – Valutazione di tossicità con *Daphnia*: valori medi e coefficiente di variazione (22 laboratori; 110 misure)

% effetto 24 h	CV %	% effetto 48 h	CV %
2	138	8	97

La quasi totalità dei laboratori (22/23) ha eseguito il test acuto con determinazione della tossicità dopo 24 e 48 ore di esposizione, nel rispetto dei criteri di validità stabiliti dalla norma e presi in considerazione nel presente studio (paragr. 6.4 POS n° 3). Il laboratorio 24 ha riportato un valore di EC₅₀- 24 h per il dicromato di potassio inferiore rispetto ai valori di riferimento compresi tra 0,6 e 2,1 mg/L, pertanto, essendo questo un criterio di validità del saggio con *Daphnia*, non è stato preso in considerazione nell'elaborazione statistica dei risultati.

Diciassette laboratori hanno preparato le soluzioni saline di cloruro di calcio, solfato di magnesio, idrogeno carbonato di sodio e cloruro di potassio, nel proprio laboratorio, 5 laboratori hanno invece acquistato tali soluzioni, mentre 1 solo laboratorio (lab 18) ha utilizzato sia soluzioni preparate che acquistate.

Sulla base dei dati ritenuti validi dei laboratori ($n = 20$) sono stati stimati per il test algale, il valore medio di Ir%; lo scarto tipo percentuale di ripetibilità (*Sr*) e lo scarto tipo percentuale di riproducibilità (*SR*) riportati nella Tabella 8.7.

Tabella 8.7– Ripetibilità e Riproducibilità del Test algale ($n = 20$)

Valore medio (Ir %)	Scarto tipo di ripetibilità percentuale (<i>Sr</i> %)	Scarto tipo di riproducibilità percentuale (<i>SR</i> %)
6,08	78	104

8.5 Conclusioni

Lo scopo dello studio collaborativo SC007, organizzato da ISPRA, è stato quello di convalidare una nuova procedura di preparazione del campione di rifiuto da sottoporre a saggi ecotossicologici, messa a punto per rispondere alle richieste normative avanzate dai Regolamenti ADR e CLP (**maggiori dettagli nel box sottostante*) in merito alla caratteristica di pericolo “ecotossico” (HP14). Tale procedura ha comportato la preparazione di 5 WAF alla concentrazione di 100 mg/L dal materiale di riferimento ISPRA RM050 costituito da un rifiuto, sui quali eseguire due saggi ecotossicologici con l'alga *P. subcapitata* e il crostaceo *D. magna*, per definirne i parametri di ripetibilità e riproducibilità.

Tra i 23 laboratori che hanno restituito i risultati delle prove, il 91% (21/23) e il 96% (22/23) hanno rispettato i criteri di validità prescritti per i saggi con alghe e con *Daphnia*, rispettivamente.

In merito al saggio acuto con *Daphnia*, non è stato possibile effettuare le elaborazioni statistiche previste, perché, una volta accertata, dalle misure eseguite dai laboratori, l'assenza di effetto, soprattutto nell'esposizione a 24 ore, la base statistica risultava del tutto inadeguata all'applicazione delle procedure di calcolo della ripetibilità e della riproducibilità.

Il calcolo dei valori medi di effetto, calcolato su 22 laboratori, ha evidenziato una tossicità finale inferiore al livello previsto per il controllo (10%) in entrambi i periodi espositivi (tabella 34). L'assenza di effetto riscontrata da molti laboratori, soprattutto nell'esposizione a 24 ore, ha reso poco rappresentativo e significativo ogni tipo di calcolo di variabilità.

Il rifiuto materiale di riferimento è risultato, nelle condizioni sperimentali applicate, non tossico.

Relativamente al saggio con l'alga *P. subcapitata* la valutazione finale di tossicità, calcolata su 20 laboratori ed espressa come inibizione del tasso di crescita (Ir %) dopo 72 ore, è risultata pari al 6%.

Benchè lo studio abbia comportato l'utilizzo di un materiale di riferimento come rifiuto, sia stato effettuato da laboratori con documentata esperienza nel campo dell'ecotossicologia e il metodo di saggio, come confermato dal rispetto dei criteri di validità, sia stato applicato correttamente, i valori di ripetibilità (*Sr* %) e riproducibilità (*SR* %) delle misure algali sono risultati molto elevati e pari a 78 % e 104 %. Non esistendo

termini di confronto relativi a misure ripetute con campioni di rifiuto, quale quello utilizzato nel presente studio collaborativo, a titolo puramente indicativo è stato assunto come riferimento il limite massimo di variabilità del 30%, indicato dall'Environment Canada (2005) e valido per misure ripetute con tossici di riferimento. Tenendo in debito conto le diversità dei parametri posti a confronto, quest'ultimo risulta di gran lunga superato.

Poiché i laboratori hanno lavorato secondo un metodo normato (ISO 8692:2012) e nel rispetto dei criteri di validità del saggio, la ripetibilità estremamente bassa risultante dallo studio può essere ragionevolmente attribuita all'applicabilità della nuova procedura di preparazione del campione di rifiuto, proposta per ottemperare alle richieste normative ADR/CLP. Queste ultime, infatti, impongono da un lato, la preparazione di singoli estratti acquosi per ogni concentrazione da utilizzare (compresa tra 1 a 100 mg), e dall'altro, una modifica del rapporto liquido/solido (L/S), che passa da 1:10 (95±5 grammi in 1 litro) della precedente metodologia (UNI EN 147356 e UNI EN 12457-2) all'attuale 1:10000 (100 milligrammi in 1 litro).

Il problema del rapporto L/S nel caso della preparazione del campione di rifiuto da sottoporre ai saggi ecotossicologici era stato già ampiamente esaminato a livello Europeo attraverso l'istituzione di gruppi di lavoro *ad hoc* (CEN TC 292: WG2 *Leaching test procedures* e WG6 *Basic characterization tests for leaching behaviour*). Gli studi, preparatori alla stesura della normativa UNI EN 147356 e UNI EN 12457-2 e riguardanti l'impiego di differenti rapporti L/S, avevano individuato, come ottimale, il rapporto L/S 1:10 nel caso di campioni di rifiuto preparati per l'esecuzione di saggi ecotossicologici con organismi acquatici.

D'altra parte, il rapporto L/S non costituisce un aspetto trascurabile nella determinazione dell'ecotossicità di un rifiuto, perché le concentrazioni delle specie inquinanti rilasciate, variano in funzione del rapporto stesso (Conti et al., 2012).

Il secondo aspetto che sembra rilevante è costituito dalle quantità di rifiuto che la normativa ADR/CLP impone di prelevare e che possono variare da 1 a 100 milligrammi. Il problema della rappresentatività del campione è stato affrontato applicando l'equazione di Gy. Rispetto alla metodologia precedentemente utilizzata (UNI EN 147356 e UNI EN 12457-2) che prevedeva l'utilizzo di un campione di ≤ 4 mm, il materiale RM050 è stato ridotto, conformemente alle simulazioni effettuate con l'equazione suddetta, ad una granulometria ≤ 250 μm (valida per un prelievo di 100 mg di rifiuto). Per quantità di rifiuto al di sotto di 100 mg, è necessario apportare ulteriori riduzioni della granulometria fino a 125-90 μm . Poiché, come è noto, i rifiuti sono spesso composti da materiali differenti e con diverse granulometrie, la necessità di effettuare tali riduzioni granulometriche può complicare molto il processo di pretrattamento dei campioni.

In conclusione, i valori di ripetibilità e riproducibilità ottenuti nel saggio algale sono tali da rendere complessa l'applicabilità della procedura proposta, e impongono un'ulteriore riflessione sul significato e sulle modalità di preparazione dei campioni di rifiuto, nonché sulla tipologia di saggi ecotossicologici da utilizzare per la determinazione della caratteristica di pericolo HP14, sulla base delle richieste ADR/CLP.

*Il recepimento della direttiva 2008/98/CE come DLgs 205/2010, e le successive modifiche apportate dal DL 2/2012 (convertito nella legge n° 28 del 24 marzo 2012 - G.U. n° 71 del 24-03-2012), hanno avuto esiti importanti in merito alle modalità di determinazione della pericolosità per l'ambiente dei rifiuti. Nella direttiva Europea viene indicato che per l'attribuzione della caratteristica di pericolo "ecotossico" (HP14) occorre fare riferimento ai criteri stabiliti nell'allegato VI della direttiva 67/548/CEE relativa alla classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose, e, qualora pertinente, devono essere applicati i valori limite di cui agli allegati II e III della direttiva 1999/45/CE relativa alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. Tali direttive, ormai abrogate, sono state sostituite dal regolamento CLP sulla classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze e delle miscele (CE/1272/2008) a decorrere dal 1° giugno 2015⁶.

In ambito nazionale, in base alla legge n° 28 del 24 marzo 2012, la caratteristica di pericolo HP14 deve essere attribuita ai rifiuti, secondo le modalità dell'accordo ADR (Accordo internazionale per il trasporto di merci pericolose su strada) per la classe 9, categoria M6, "Materie pericolose per l'ambiente acquatico, liquide" ed M7 "Materie pericolose per l'ambiente acquatico, solide".

I criteri di classificazione dell'ADR, pensati per il trasporto delle merci, non sono tuttavia immediatamente applicabili ai rifiuti. Per i beni e le merci, di solito prodotti intenzionalmente, la composizione è nota nella maggior parte dei casi. Diversamente, nel caso dei rifiuti, spesso la composizione è nota solo parzialmente o non è nota affatto, rendendo di fatto molto complessa la valutazione della pericolosità. D'altro canto, nel caso dei rifiuti, non essendo richiesta l'individuazione dei livelli di pericolo (attraverso le definizioni di "Acuto 1", "Cronico 1" e "Cronico 2"), è possibile semplificare la procedura e verificare, per l'attribuzione della caratteristica HP14, solo la presenza del grado di pericolo più basso (Bonato et al., 2012). La valutazione di ecotossicità viene, inoltre, ad essere limitata al solo comparto acquatico.

Per rispondere ai nuovi criteri ADR/CLP la metodologia di preparazione del campione di rifiuto, da sottoporre ai saggi, deve essere modificata rispetto alla procedura regolata dalle norme UNI EN 14735 e UNI EN 12457-2, studiate specificamente per i rifiuti e consolidate attraverso un interconfronto internazionale (Moser and Rombke, 2009). Tale metodologia, comportava la preparazione di un lisciviato con un rapporto liquido/solido (L/S) pari a 10 (95± 5 grammi in 1 litro di acqua MilliQ), seguita dalla preparazione di diluizioni seriali saggiate con una batteria di test ecotossicologici. I dati di tossicità (LC₅₀, EC₅₀, etc) ottenuti sono espressi in termini percentuali. Come tali, i dati non risultano più compatibili con l'adozione dell'approccio ADR/CLP che prevede limiti di riferimento espressi in mg/L. D'altra parte, considerare una diluizione 1:1000 (o 1:10000) di un campione prodotto lisciviando 100 grammi di rifiuto in 1 litro di acqua (secondo EN 14735) equivalente *a priori* ad un lisciviato prodotto immergendo 100 milligrammi (o 10 milligrammi) in 1 litro di acqua sembra errato e di dubbio valore scientifico. Infatti, le concentrazioni delle specie inquinanti rilasciate da un rifiuto, variano rispetto al rapporto L/S utilizzato. Per questo motivo, come riportato nel documento CEN/TS 14405, erano state studiate procedure di lisciviazione con differenti rapporti liquido/solido.

Per quanto riguarda i saggi ecotossicologici con organismi acquatici, da applicare ai rifiuti, il regolamento ADR, fa riferimento ai metodi descritti dalle Linee Guida OECD:

- n° 203 per la determinazione del valore di LC₅₀-96 ore con i pesci (o un metodo equivalente);
- n° 202 per la determinazione del valore di EC₅₀-48 ore con il crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* (o un metodo equivalente);
- n° 201 per la determinazione del valore di ErC₅₀-72/96 ore con alghe monocellulari d'acqua dolce (o un metodo equivalente).

A livello Europeo, se le modifiche alla decisione 2000/532/CE confermeranno l'applicazione del regolamento CLP (2006/1272/ CE, come modificato dal Regolamento 2011/286/CE), anche per la classificazione dei rifiuti, non ci saranno variazioni per quanto riguarda i metodi dei saggi ecotossicologici. Questi, infatti, sono gli stessi dell'Allegato C (C1 Tossicità acuta per i pesci, C2 Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia* sp; C3 Alghe di acqua dolce e cianobatteri, saggio di inibizione della crescita) di cui al Regolamento CE/440/200, cui il CLP fa riferimento.

I valori limite di riferimento per l'attribuzione della caratteristica di pericolo HP14, secondo ADR (validi allo stato presente) e secondo CLP (in vigore dal 1 giugno 2015), prevedono la valutazione di tossicità per l'ambiente acquatico con pesci (LC₅₀ a 96 ore) crostacei (EC₅₀ a 48 ore) e alghe (ErC₅₀ a 72/96 ore) e sono compresi tra 1 e 100 mg/L (Conti et al., 2012). I tre saggi non sono alternativi, tuttavia, affinché il rifiuto sia considerato pericoloso per l'ambiente, è sufficiente che uno solo di essi risulti positivo.

Come si evince dai valori dei limiti di riferimento un problema derivante dall'applicazione dell'approccio ADR/CLP è costituito dalla necessità di dover saggiare porzioni di prova molto piccole, ≤ 100 mg/L, che potrebbero risultare poco rappresentative del campione di rifiuto analizzato.

⁶ Anche nel periodo transitorio potevano essere utilizzati i criteri stabiliti dal regolamento CLP

8.6 Riferimenti

- Bonato T., D. De Dominicis, F. Loro e L. Tomiato (2012) Pericolosità per l'ambiente: l'attribuzione ai rifiuti. *Ambiente & Sicurezza*, 10:74-81.
- CEN/TS 14405 (2004) Characterization of waste – Leaching behaviour tests – Up-flow percolation test (under specific conditions).
- CEN/TR 16110 (2010) Characterization of waste – Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste.
- ECETOC (1996) Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances. Monograph n° 26.
- Conti D., S. Balzamo, A. Paina, A. Pati, C. Martone, V. Bellaria (2012) Valutazione della pericolosità per l'ambiente dei rifiuti (H14): definizione della procedura analitica. Atti Giornate di studio 5^a Edizione “Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate” - Livorno 7-9 novembre 2012 - pp 201.
- ECHA (2012) Guidance on Application of CLP.
- Environment Canada (2005) “Guidance Document on Statistical for Environmental Toxicity Tests” - EPS1/RM/46 March 2005 (with 2007 amendments) .
- EN ISO 5667-3: 2012 Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples.
- ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- ISO 8692:2012 Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- Moser M., and J. Römbke (2009) Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test. Ed. Springer.
- OECD (2000) Series on Testing and Assessment. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Number 23. [14] OECD (2001) Series on Testing and Assessment. - Guidance Document on the Use of the Harmonised System for the Classification of Chemicals which are Hazardous for the Aquatic Environment. Number 27.
- Paina A., D. Conti, S. Balzamo, A. Pati, C. Martone, V. Bellaria (2012) I rifiuti e la pericolosità per l'ambiente (H14): evoluzione normativa e quadro di riferimento. Atti Giornate di studio 5^a Edizione “Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate” - Livorno 7-9 novembre 2012 - pp194.
- UNI EN 14735 (2005) Caratterizzazione dei rifiuti – Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.
- UNI EN 12457-2 (2004) Caratterizzazione dei rifiuti – Lisciviazione – Prova di conformità per la lisciviazione di rifiuti granulari e di fanghi- Parte 2: prova a singolo stadio, con un rapporto liquido/solido di 10L/Kg, per materiali con particelle di dimensioni minori di 4 mm (con o senza riduzione delle dimensioni).
- UNI EN ISO 6341: 2013 Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicità acuta.

9. ISPRA IC033 “SAGGI DI TOSSICITÀ CON *VIBRIO FISCHERI* E *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA* SU TOSSICO CIECO”

Scopo	Valutare la prestazione dei laboratori nella determinazione dell'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal batterio <i>Vibrio fischeri</i> e dell'inibizione di crescita dell'alga verde monocellulare <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
Saggio Tossico di riferimento Tossico cieco Materiale di prova Sistema di saggio	Tossicità acuta (24 h) entrambi con tossico cieco e di riferimento dicromato di potassio (K ₂ Cr ₂ O ₇) 1 unità di ISPRA RM065 Batteri bioluminescenti della specie <i>Vibrio fischeri</i> nella forma di sospensione congelata proveniente da preparati commerciali e organismi della specie <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> provenienti da allevamenti presenti nel proprio laboratorio o da forme immobilizzate in matrice
Numero di Partecipanti	*20 ARPA/APPA e 1 laboratorio privato
Dettagli dello studio	I parametri richiesti, relativi alla prova definitiva del saggio di tossicità con <i>V. fischeri</i> , sono i seguenti: <ul style="list-style-type: none"> • valore di EC₅₀ - 30 minuti con il TR, dicromato di potassio • valore di EC₅₀ - 30 minuti con il TC, ISPRA RM065 I parametri richiesti, relativi alla prova definitiva del saggio di tossicità con <i>P. subcapitata</i> , sono i seguenti: <ul style="list-style-type: none"> • valore di EC₅₀-72±2 h con il TR, dicromato di potassio • valore di EC₅₀-72±2 h con il TC, ISPRA RM065

*Alla prova valutativa hanno aderito 21 laboratori: 20 laboratori ARPA/APPA) e 1 laboratorio privato, Ad ogni laboratorio è stato attribuito un codice identificativo, cui sono stati associati i risultati. (tabella 9.1).

9.1 Materiali

Per l'esecuzione delle prove, gli organizzatori del confronto interlaboratorio (CI) hanno distribuito il tossico cieco (TC), solfato di zinco eptaidrato, come materiale di riferimento ISPRA RM065. Al contrario, per il tossico di riferimento (TR), dicromato di potassio, è stato consentito ad ogni partecipante l'utilizzo del proprio sale comunemente impiegato in laboratorio.

Il tossico cieco (ISPRA RM065) per le prove ecotossicologiche con *V. fischeri* e *P. subcapitata* è costituito dal sale solfato di zinco eptaidrato (ZnSO₄·7H₂O) 99% ACS Sigma-Aldrich (CAS 7446-20-0). Il materiale ISPRA RM065 è stato confezionato in contenitori di polietilene da 4 mL con tappo a pressione. Ogni unità contiene circa 1 g di materiale.

Per la prova con batteri bioluminescenti sono stati utilizzati ceppi NRRL B-11177 della specie *Vibrio fischeri* nella forma di sospensione congelata proveniente da preparati commerciali. Per la prova con alghe sono stati utilizzati organismi della specie *Pseudokirchneriella subcapitata* provenienti da allevamenti presenti nel proprio laboratorio o da forme immobilizzate in matrice (alginate beads).

9.2 Disegno Sperimentale

Il disegno sperimentale della prova ha previsto la determinazione dell'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal batterio *Vibrio fischeri* e la determinazione dell'inibizione di crescita dell'alga verde monocellulare *Pseudokirchneriella subcapitata* per effetto di un tossico di riferimento (dicromato di potassio, K₂Cr₂O₇) e di un tossico cieco (solfato di zinco eptaidrato, ZnSO₄·7H₂O), al fine di acquisire informazioni circa il grado di dispersione dei risultati forniti dai laboratori impegnati nei saggi summenzionati.

I saggi ecotossicologici sono stati eseguiti dai laboratori sulla base delle indicazioni riportate dal protocollo fornito dagli organizzatori. Il saggio con *Vibrio fischeri* è stato richiesto di eseguirlo in base alla norma UNI EN ISO 11348-3: 2009; il saggio algale applicando la norma UNI EN ISO 8692: 2012. Per il saggio con batteri, ciascun laboratorio dovrà presentare i risultati relativi ad 1 saggio di inibizione della bioluminescenza con *Vibrio fischeri*, per ciascun materiale di prova (TR e ISPRA RM065), con determinazione dell'EC50-30 minuti.

Il saggio con il tossico ISPRA RM065 deve comportare due fasi:

- prova preliminare per determinare l'intervallo di concentrazioni (range-finding test) entro il quale deve essere eseguita la prova definitiva;
- prova definitiva per il calcolo della EC50-30 minuti.

Per il saggio algale, ciascun laboratorio dovrà presentare i risultati relativi ad 1 saggio di inibizione di crescita con *P. subcapitata*, per ciascun materiale di prova (TR e ISPRA RM065), con determinazione dell'ErC50-72 ± 2 ore.

Il saggio algale è da considerarsi valido secondo i criteri indicati dalla norma UNI EN ISO 8692: 2012 (paragrafo 8).

I dati sperimentali, unitamente ad alcune informazioni relative alle modalità di esecuzione e ai criteri di validità dei saggi, sono stati restituiti dai laboratori partecipanti all'organizzatore, mediante la "Scheda dei risultati" entro i termini temporali fissati nel calendario delle attività.

9.2.1 Valori assegnati

Il valore di riferimento assegnato per l'EC50 è stato valutato sulla base dei risultati dei laboratori partecipanti. In particolare, sono stati determinati i valori di consenso per:

valore di EC50-30 min (*V. fischeri*) e di ECr50-72±2 h (*P. subcapitata*) con il TR, dicromato di potassio (K₂Cr₂O₇)

valore di EC50-30 min (*V. fischeri*) e di ECr50-72±2 h (*P. subcapitata*) con il TC, RM065 (solfato di zinco eptaidrato, ZnSO₄·7H₂O).

Tutti i valori di EC50, inviati dai laboratori, sono stati sottoposti al test di Shapiro-Wilk per la verifica della normalità. Successivamente, sono stati trasformati in logaritmo base 10 secondo quanto riportato nel documento canadese "Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests" [1].

I valori di consenso sono stati ottenuti quale media robusta, anti-trasformata, dei valori logaritmici di EC50 [2].

Al valore assegnato di consenso sono associati un limite inferiore (Lim. Inf) e uno superiore (Lim. Sup.) di attenzione, pari, rispettivamente, al valore assegnato più o meno due volte il valore dello scarto tipo robusto del circuito ISPRA-IC033 espressi in forma anti-trasformata dei valori logaritmici [1]. Lo scarto tipo robusto del circuito IC033 è stato ottenuto tramite il SOFTWARE AMC sulla base dei valori logaritmici e successivamente anti-trasformato secondo quanto riportato nella Linea guida canadese [1].

Tabella 9.1– *Laboratori ARPA/APPA e laboratori di altre Istituzioni che hanno restituito i risultati della prova valutativa ISPRA IC033*

Ente

ARPA UMBRIA - UOLM-SEZIONE DI ECOTOSSICOLOGIA, LABORATORIO ARPA UMBRIA SITO DI PERUGIA
Agenzia provinciale per l'ambiente - Bolzano - Laboratorio biologico
Arpa Lombardia - Settore Laboratori - U.O. Laboratorio di Brescia
ARPAM DIPARTIMENTO DI MACERATA
ARPA LOMBARDIA - Settore Laboratori - U.O. Laboratorio di Milano - Sede di Parabiago
ARPAT – UO BIOLOGIA AVL
HERA Spa
ARPA EMILIA ROMAGNA Sezione Provinciale di Ravenna
ARPA EMILIA ROMAGNA Struttura Oceanografica Daphne - Laboratorio acque e sedimenti
ARPA EMILIA ROMAGNA Sezione Provinciale di Ferrara
S.O. Ecotossicologia/Microbiologia (c/o Laboratorio Tematico Fitofarmaci)
ARPAL Dipartimento Provinciale di Genova SETTORE BIOLOGIA
ARPAL Dipartimento Provinciale di La Spezia SETTORE BIOLOGIA
ARPA PUGLIA - Dipartimento Provinciale di Foggia - Polo di Specializzazione di Biologia Avanzata delle Acque/U.O.S.
Biotossicologia
ARPA PUGLIA - Dipartimento Provinciale di Bari - Servizio Laboratori
– U.O.S. Biologia delle Acque/Laboratorio Ecotossicologia
ARPAV -DIPARTIMENTO REGIONALE LABORATORI - SERVIZIO LABORATORIO DI VENEZIA
ARTA Abruzzo Distretto di Pescara
ARTA Abruzzo Distretto di L'Aquila
ARPA BASILICATA – CENTRO RICERCHE METAPONTO
ARPA Calabria - Laboratorio bionaturalistico DAP Catanzaro
ARPA Calabria - Laboratorio bionaturalistico DAP Reggio Calabria
ARPA Piemonte - Dipartimento di Cuneo

9.3 Elaborazione statistica e criteri di valutazione dell'accettabilità dei risultati

I risultati dei laboratori partecipanti sono stati sottoposti ad una accurata verifica preliminare. La verifica ha riguardato la completezza delle informazioni inviate, propedeutiche all'elaborazione statistica, e la corrispondenza tra quanto dichiarato dai laboratori e quanto previsto dal protocollo del circuito. In alcuni casi si è reso necessaria una fase ulteriore di riscontro con i singoli laboratori al fine di acquisire integrazioni e/o correzioni dei dati ricevuti.

Le prestazioni dei laboratori sono state valutate graficamente rispetto al valore di riferimento assegnato per l'EC₅₀ e ai limiti di attenzione inferiore e superiore corrispondenti.

9.4 Risultati

Tutti i 21 laboratori hanno restituito i risultati. Undici laboratori, pari al 52%, hanno effettuato entrambi i saggi con batteri e alghe. Considerando ogni saggio singolarmente, 19 laboratori (90%) hanno eseguito quello con *V. fischeri* e 13 laboratori (62%) quello con *P. subcapitata*.

Nelle tabelle da 9.3 a 9.6 sono riportati in forma tabellare i risultati inviati dai laboratori partecipanti al CI riguardanti sia le misure ecotossicologiche che le condizioni di validità e di esecuzione di ciascun saggio, sulla base di quanto richiesto dal protocollo del CI.

Specificamente, per la prova con *V. fischeri* (Tabelle 9.3 e 9.4), sono state considerate le seguenti condizioni di validità:

- un fattore di correzione (fkt) a 30 minuti compreso nell'intervallo 0,6-1,8 (UNI EN ISO 11348-3);
- un valore di EC₅₀-30 minuti compreso tra 35,46 e 70,34 mg K₂Cr₂O₇ L⁻¹ per il tossico di riferimento, dicromato di potassio (UNI EN ISO 11348-3);
- l'utilizzo di lotti di batteri in forma di sospensione congelata non scaduti al momento della prova.

Per il saggio con batteri, i partecipanti sono stati, inoltre, lasciati liberi di utilizzare il sistema di determinazione della bioluminescenza comunemente impiegato nel proprio laboratorio. A tale proposito, 17 laboratori (89%) hanno utilizzato il sistema Microtox, 1 laboratorio ha utilizzato il sistema Lumistock (n° 22) e 1 laboratorio (n° 8) ha utilizzato il sistema Easychem TOX (Systea).

In entrambe le prove con TR e TC, tutti i laboratori hanno impiegato ceppi di batteri validi e hanno presentato valori di fkt-30 min compresi nell'intervallo previsto.

Per quanto riguarda l'EC₅₀-30 min per il TR, 18 laboratori hanno presentato valori entro il limite previsto dalla norma UNI EN ISO 11348-3. Il laboratorio 06 che ha ottenuto un valore di EC₅₀ (32,78 mg/L) inferiore, non è stato considerato per l'elaborazione statistica e per la determinazione del valore di consenso per il TR.

Tutti i 19 laboratori che hanno eseguito il saggio con TC sono stati considerati per l'elaborazione statistica e per la determinazione del valore di consenso per il TC. Sedici (17/19) laboratori hanno effettuato il test preliminare range-finding, 1 laboratorio (n° 10) lo ha sostituito con l'utilizzo di più repliche a concentrazioni iniziali differenti e 1 laboratorio (n° 8) ha effettuato solo il test definitivo.

Specificamente, per la prova con *P. subcapitata* (Tabelle 9.5 e 9.6), sono state considerate le seguenti condizioni di validità:

1. un tasso di crescita medio del controllo, dopo 72 ore, pari ad almeno 1,4 g-1; un coefficiente di variazione del tasso di crescita nel controllo, dopo 72 ore, non superiore al 5%; il pH del controllo, non aumentato più di 1,5 unità al termine del saggio (UNI EN ISO 8692).
2. un valore di ECr₅₀-72 ±2 h compreso tra 0,65 e 1,73 mg K₂Cr₂O₇ L⁻¹ per il TR, dicromato di potassio, (UNI EN ISO 8692);
3. nel caso di alghe immobilizzate in matrice (Alginate Beads, AB), l'utilizzo di lotti non scaduti al momento della prova.

Per il saggio algale, i laboratori sono stati lasciati liberi di utilizzare i propri sistemi di determinazione dell'inibizione di crescita e di conta algale. A tale proposito, 8 laboratori hanno impiegato allevamenti algali, 4 laboratori hanno utilizzato AB, mentre 1 solo laboratorio (n° 22) non ha riportato il tipo di organismo utilizzato. La maggior parte dei laboratori (7) ha effettuato la conta algale con l'ausilio del Coulter Counter, mentre 4 e 2 laboratori hanno utilizzato, rispettivamente, la determinazione spettrofotometrica e il microscopio (conta in camera).

I valori di ECr₅₀-72±2 h per le prove con il TR e con il TC, sono stati ricalcolati da ISPRA. Infatti, un errore presente nella cella "L22" del foglio di calcolo della scheda risultati inviata dall'organizzatore, ha comportato, nella replica 3, tassi di crescita con lo stesso risultato nelle concentrazioni 9.5 e 9.6, compromettendo la possibilità, da parte dei laboratori, di una corretta determinazione del valore di ECr₅₀. Poiché l'accertamento dell'errore è avvenuto dopo la consegna dei risultati, l'organizzatore ha effettuato la correzione dei fogli di calcolo ricevuti e ha ricalcolato i valori di ECr₅₀. Le nuove schede con i dati corretti sono state nuovamente inviate ai laboratori per una loro documentazione.

Per quanto riguarda l'ECr₅₀-72±2 h per il TR, 11/13 laboratori hanno ottenuto valori entro il limite previsto dalla norma UNI EN ISO 8692. Il laboratorio n° 05 che ha ottenuto un valore di EC₅₀ (1,74 mg/L) di poco superiore, non è stato considerato per l'elaborazione statistica e per la determinazione del valore di consenso per il TR.

Per quanto riguarda l'ECr₅₀-72±2 h per il TC, 12/13 laboratori hanno rispettato i criteri di validità del saggio algale. Tutti i laboratori hanno effettuato il test preliminare per la definizione delle concentrazioni di TC. Dodici laboratori (12/13) sono stati considerati per l'elaborazione statistica e la determinazione del valore di consenso per il TC.

Nella Tabella 9.2 sono mostrati i valori assegnati di riferimento EC₅₀ (anti-logaritmo e logaritmo) con i rispettivi limiti di attenzione, per il TR, dicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) e per il tossico cieco RM065 (solfato di zinco eptaidrato, ZnSO₄·7H₂O) ottenuti nelle prove con batteri (*V. fischeri*) e alghe (*P. subcapitata*).

Tabella 9.2– Valori assegnati di riferimento EC₅₀ (anti-logaritmo e logaritmo) con i rispettivi limiti di attenzione

Parametro	Tossico		n	Valore assegnato	Lim. Sup	Lim. Inf
V. fischeri	TR (K ₂ Cr ₂ O ₇)	Anti-log (mg/L)	18	50,93	67,40	38,49
		Log ₁₀		1,71	1,83	1,59
EC ₅₀ -30 min	TC (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	Anti-log (mg/L)	19	2,59	10,84	0,60
		Log ₁₀		0,41	1,04	-0,21
P. subcapitata	TR (K ₂ Cr ₂ O ₇)	Anti-log (mg/L)	11	1,00	1,58	0,64
		Log ₁₀		0,001	0,20	-0,20
ECr ₅₀ -72±2 h	TC (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	Anti-log (mg/L)	12	0,46	0,98	0,21
		Log ₁₀		-0,34	-0,01	-0,67

Nelle Figure da 9.1 a 9.4 sono riportati in forma grafica i risultati del circuito.

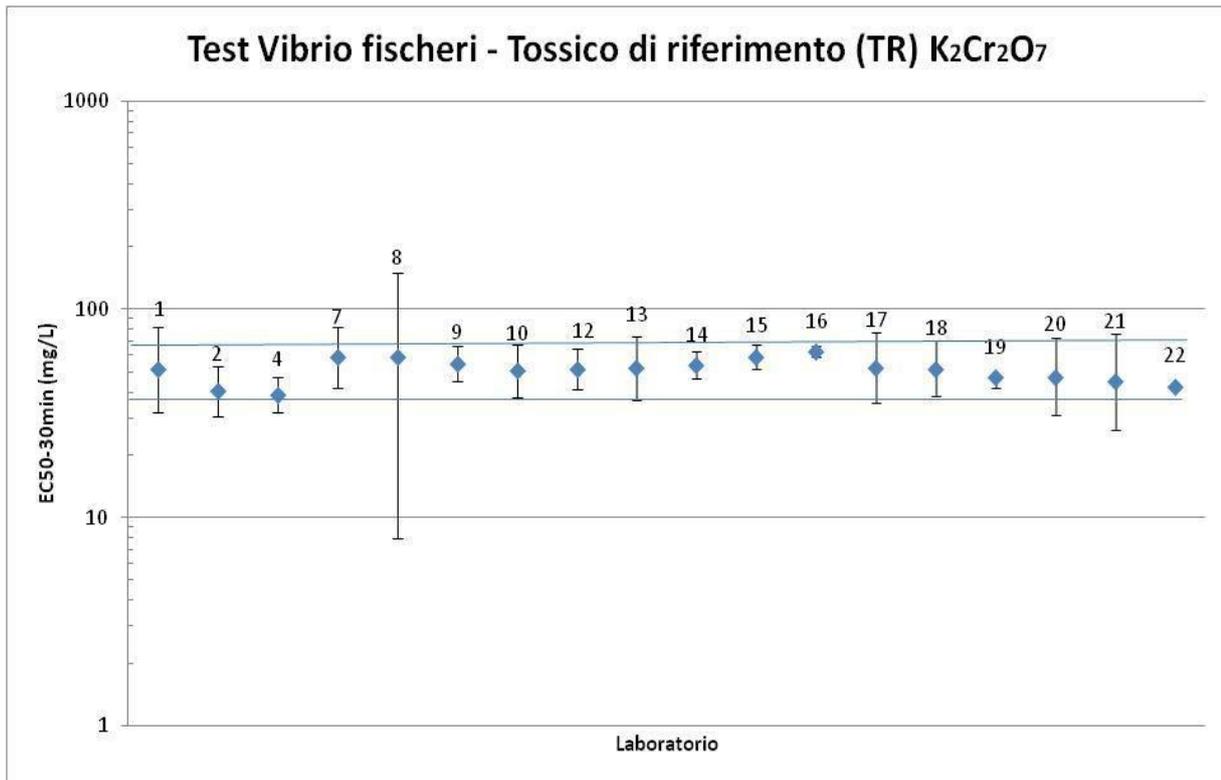


Figura 9.1 - Test con *Vibrio fischeri*. Valori di EC₅₀ -30min (in scala logaritmica) ottenuti con il tossico di riferimento (K₂Cr₂O₇). Le bande blu rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito).

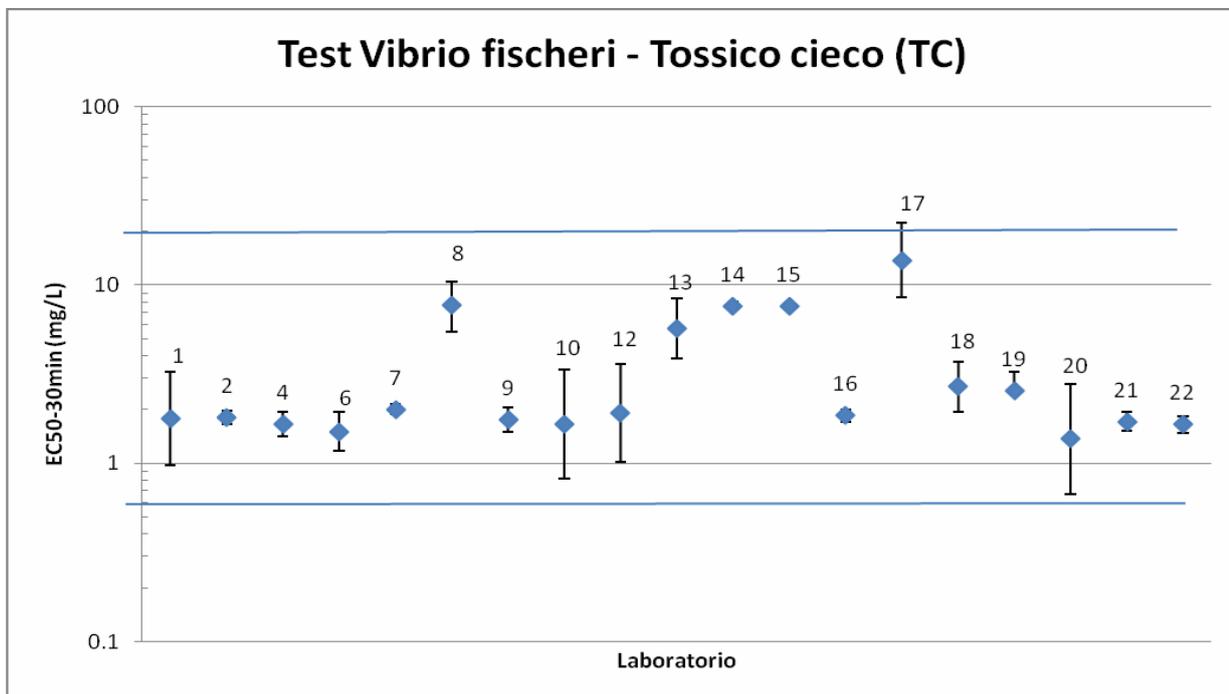


Figura 9.2 - Test con *Vibrio fischeri*. Valori di EC₅₀-30min (in scala logaritmica) ottenuti con il tossico cieco RM065 (ZnSO₄·7H₂O). Le bande blu rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito).

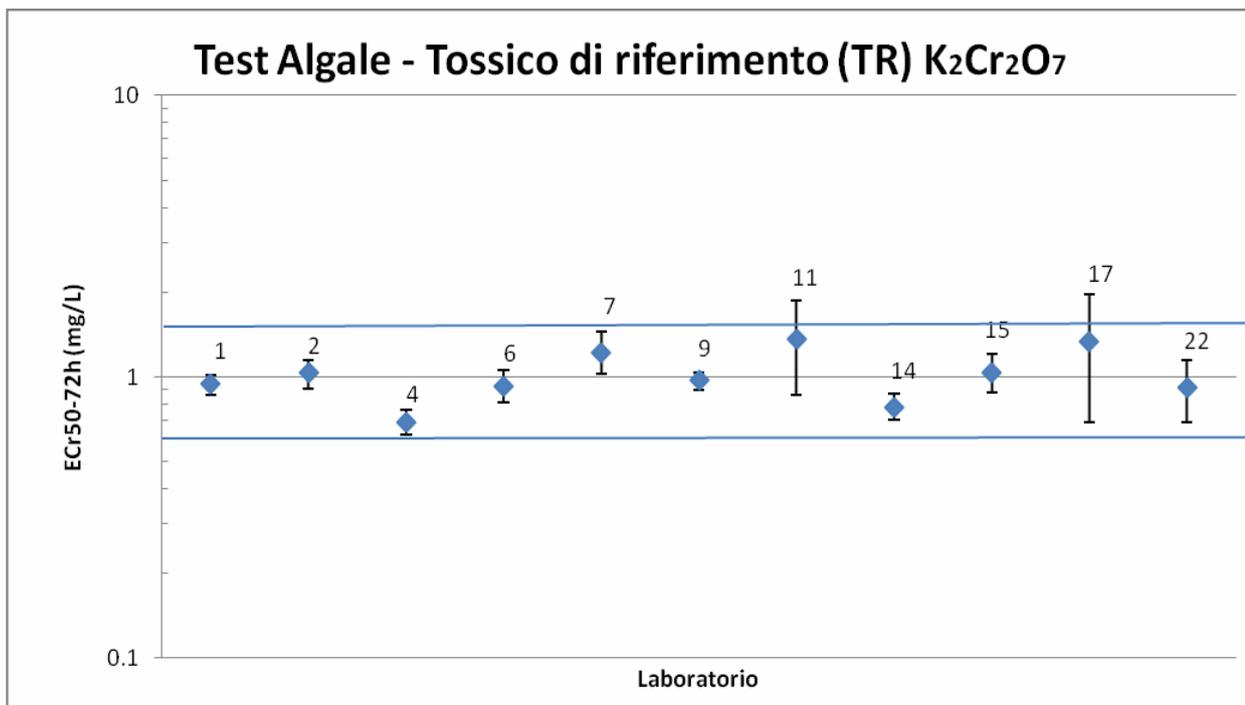


Figura 9.3 - Test con *P. subcapitata*. Valori di ECr_{50-72h} (in scala logaritmica) ottenuti con il tossico di riferimento ($K_2Cr_2O_7$). Le bande blu rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito)

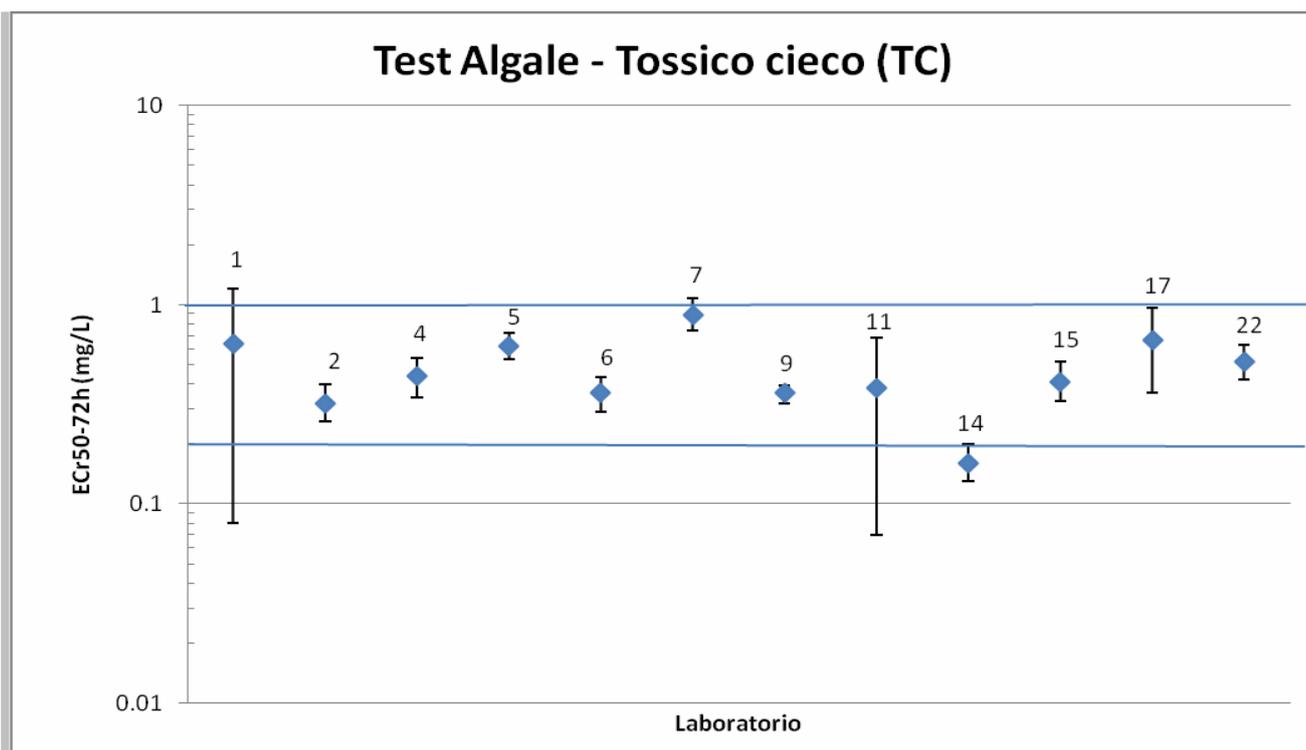


Figura 9.4 - Test con *P. subcapitata*. Valori di ECr_{50-72h} (in scala logaritmica) ottenuti con il tossico cieco RM065 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Le bande blu rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito).

9.5 Conclusioni

Il confronto interlaboratorio ISPRA IC033, organizzato dal Servizio di Metrologia Ambientale AMB LAB, ha consentito di verificare il livello di dispersione, tra laboratori, dei risultati delle misure di inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal batterio *Vibrio fischeri* e delle misure di inibizione di crescita dell'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, dopo esposizione al tossico di riferimento, dicromato di potassio e al tossico cieco, solfato di zinco eptaidrato, distribuito come materiale di riferimento ISPRA RM065.

Sebbene si debba registrare, rispetto agli anni passati, una partecipazione più contenuta dei laboratori ARPA/APPA al confronto interlaboratorio ISPRA, nondimeno si osserva, ancora una volta, una generale corretta applicazione dei metodi di misura e il rispetto dei criteri di validità prescritti per i saggi ecotossicologici, oggetto del circuito.

Questo aspetto si traduce in un'ottima risposta in termini di dispersione dei risultati dei laboratori per quanto riguarda la prova con il tossico di riferimento con entrambi gli organismi. Infatti, rispetto ai criteri raccomandati da Environment Canada [1], si rilevano valori di CV percentuali pari al 13% e al 21% con *V. fischeri* e *P. subcapitata*, rispettivamente.

Il valore massimo di CV, pari al 93%, si rileva per la determinazione dell' EC_{50-30} min con il tossico cieco, a causa della presenza di valori anomali.

I grafici dei risultati dei laboratori mostrano la maggioranza dei laboratori ricadere all'interno dei limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo del circuito) indicando ulteriormente la complessiva idoneità delle misure eseguite dai laboratori nel contesto del circuito ISPRA IC033, tanto per il tossico di riferimento quanto per il tossico cieco.

Per la prova con algha, il valore di consenso di $ECr_{50-72\pm 2}$ h ($n=12$), per il tossico cieco, pari a 0,46 (0,21-0,98) mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ L-1, ottenuto nel CI, è risultato comparabile con quanto ottenuto da Paixão et al., 2008 (0,50 mg/L nel test in beuta e 0,45 mg/L nel test in piastra multi pozzetto da 96) e da Vasseur et al., 1988 (da 0,40 a 1,60 mg/L) con *P. subcapitata* [5] [6].

Nel caso dei batteri, invece, il valore di consenso di EC_{50-30} min ($n=19$) per il tossico cieco, pari a 2,59 (0,60-10,84) mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O \cdot L-1$, ottenuto nel CI, si discosta molto dai dati di riferimento ($n=14$) riportati nella tabella C1 della norma UNI EN ISO 11348-3 che indicano per il solfato di zinco eptaidrato un intervallo di sensibilità compreso tra 6,33 e 12,36 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O \cdot L-1$ (1,44 - 2,90 mg $Z2+ \cdot L-1$).

Solo tre laboratori - n° 8, 14 e 15 - hanno registrato valori di EC_{50-30} min (7,75; 7,60 e 7,61 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O \cdot L-1$) che rientrano nell'intervallo di precisione indicato dalla norma e uno di essi (il lab n° 8) ha utilizzato batteri del sistema Easychem TOX (Systea).

I batteri Microtox hanno registrato nella maggioranza dei casi livelli di sensibilità allo zinco maggiori rispetto a quanto riportato nella norma che sono, tuttavia, compatibili con quanto indicato dai certificati di analisi che accompagnano i lotti di batteri (EC_{50-15} min: 3,52 e 4,84 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O \cdot L-1$, pari a 0,80 e 1,10 mg $Z2+ \cdot L-1$).

Al termine di questo CI, si vuole evidenziare, ancora una volta, l'importanza dell'organizzazione e della partecipazione costante e assidua ai circuiti di interconfronto fra laboratori. Questi, infatti, costituiscono strumenti indispensabili per la valutazione esterna dell'affidabilità dei risultati analitici e per il miglioramento delle prestazioni di un laboratorio. La partecipazione a prove collaborative, nelle quali sono previste riunioni di confronto tecnico fra i partecipanti, agevola l'individuazione di eventuali criticità e il miglioramento continuo delle prestazioni analitiche.

9.6 Riferimenti

-Environment Canada (2005) "Guidance Document on Statistical for Environmental Toxicity Tests" EPS1/RM/46 March 2005 (with 2007 amendments).

-ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by Interlaboratory comparison. [3]

UNI EN ISO 11348-3 (2009) Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri bioluminescenti) Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati

-ISO 8692 (2012) Water quality -- Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae.

-Paixao et al., (2008) Ecotoxicology vol 17: 165-171

-Vasseur et al.,(1988) Environ. Toxicol. And Water Qual. vol 3: 331-343

Tabella 9.3– Saggio con *V. fischeri*: misure di EC₅₀-30 min per il tossico di riferimento dicromato di potassio e condizioni di esecuzione.

Cod LAB	Sistema	Scadenza batteri	Tossico di riferimento			
			fKt	mg K ₂ Cr ₂ O ₇ L-1	IC 95%	
					LL	UL
1	M	01.06.2017	1,1	51,28	31,99	82,19
2	M	01.03.2017	1,37	40,49	30,63	53,52
4	M	01.04.2017	1,524	38,93	31,88	47,5
6	M	30.04.2017	1,258	32,78	30,1	35,72
7	M	01.03.2017	1,374	58,8	41,85	82,62
8	E	01.05.2018	1,8	59,2	7,9	148,9
9	M	01. 2016	1,096	54,68	44,98	66,45
10	M	01.10.2016	0,9525	50,72	37,86	67,94
12	M	30.04.2017	0,671	51,65	41,46	64,35
13	M	01.09.2016	0,9688	52,03	36,76	73,65
14	M	01.03.2017	1,12	53,73	46,36	62,26
15	M	01.08.2016	0,9174	59,17	51,6	67,83
16	M	01.04.2017	1,136	62,5	58,65	66,6
17	M	01.10.2016	1,63	52,64	35,64	77,73
18	M	03.2017	1,498	52,00	38,46	70,32
19	M	01.08.2016	0,7	47,06	42	48
20	M	30.11.2015	0,7272	47,29	30,91	72,35
21	M	01.01.2016	0,99	44,97	26,34	76,77
22	L	31.01.2016	0,96	42,64	42,56	42,72

Abbreviazioni: E: sistema EasyChem (Systea); IC: Intervallo di confidenza al 95%; L: sistema Lumistock (Dr Lange); LL: Low Limit (limite inferiore); M: Sistema Microtox (Ecotox); UL: Upper limit (limite superiore).

Tabella 9.4 - – Saggio con *V. fischeri*: misure di EC50-30 min per il tossico cieco RM065 e condizioni di esecuzione.

Cod LAB	Sistema	Scadenza batteri	Tossico cieco RM065			
			f _{K1}	mg ZnSO ₄ ·7H ₂ O L ⁻¹	IC 95%	
					LL	UL
1	M	01.06.2017	0,9	1,77	0,97	3,24
2	M	01.03.2017	1,472	1,81	1,66	1,98
4	M	01.04.2017	1,26	1,65	1,41	1,93
6	M	30.04.2017	1,28	1,5	1,17	1,93
7	M	01.03.2017	1,336	2,0	1,88	2,14
8	E	01.05.2018	1,8	7,75	5,5	10,45
9	M	01. 2016	1,428	1,753	1,501	2,049
10	M	01.10.2016	1,267	1,66	0,8177	3,374
12	M	30.04.2017	0,7313	1,918	1,018	3,612
13	M	01.09.2016	1,00	5,71	3,86	8,44
14	M	01.03.2017	1,26	7,6	7,23	8
15	M	01.08.2016	1,3622	7,614	7,267	7,977
16	M	01.04.2017	1,273	1,85	1,7	2,01
17	M	01.10.2016	1,36	13,73	8,49	22,21
18	M	03.2017	1,328	2,69	1,95	3,71
19	M	01.08.2016	0,9	2,55	2,45	3,27
20	M	30.11.2015	0,8749	1,37	0,67	2,77
21	M	01.01.2016	0,95	1,71	1,52	1,93
22	L	31.01.2016	0,99	1,66	1,48	1,84

Abbreviazioni: E: sistema EasyChem (Systea); IC: Intervallo di confidenza al 95%; L: sistema Lumistock (Dr Lange); LL: Low Limit (limite inferiore); M: Sistema Microtox (Ecotox); UL: Upper limit (limite superiore).

Tabella 9.5 - Saggio con *P. subcapitata*: misure di ECr50-72±2h per il tossico di riferimento e condizioni di esecuzione. I valori di ECr50-72±2h riportati sono calcolati da ISPRA.

LAB	Organismi	Metodo di conta	Ci (cells/mL)	Criteri di validità secondo UNI EN ISO 8692			Tossico di riferimento		
				□ Con 72 h	CV% Con 72 h	□ pH Con	mg K ₂ Cr ₂ O ₇ L ⁻¹	LL	UL
1	A	CC	10000	1,88	0,07	-0,5	0,94	0,86	1,01
2	A	CC	8860	1,91	0,41	-0,2	1,03	0,91	1,15
4	A	SP	10000	1,89	1,34	1,2	0,69	0,62	0,76
5	A	CC	5000	1,62	1,24	0,06	1,74	1,51	2,00
6	A	SP	10000	1,71	1,76	0,7	0,93	0,81	1,06
7	AB	CC	9850	1,4	0,18	1,2	1,22	1,02	1,45
9	A	C	10000	1,58	2,83	0,95	0,97	0,9	1,04
11	A	C	10000	1,42	1,33	-0,85	1,36	0,86	1,86
14	A	CC	10000	1,57	1,21	0,7	0,78	0,70	0,87
15	AB (17.02.2016)	SP	10000	1,49	0,44	0,23	1,03	0,88	1,21
17	AB (1.11.2015)	CC	9789	1,54	4,55	0,6	1,33	0,69	1,97
19	AB (17.02.2016)	SP	85480	0,60	4,66	0,22	-0,30	-7,7	7,09
22	NR	CC	10000	1,44	1,06	0,2	0,92	0,69	1,14

Abbreviazioni: A: allevamento; AB: Alginate Beads; C: Conta in camera; CC: Coulter Counter; Con: Controllo; CV: coefficiente di variazione; □pH: variazione del pH; IC: Intervallo di confidenza al 95%; LL: Low Limit (limite inferiore); □□□ tasso di crescita □□SP: spettrofotometro; UL: Upper limit (limite superiore).

Tabella 9.5 - Saggio con *P. subcapitata*: misure di $EC_{50-72\pm 2h}$ per il tossico cieco RM065 e condizioni di esecuzione. I valori di $EC_{50-72\pm 2h}$ riportati sono calcolati da ISPRA.

LAB	Organismi	Metodo di conta	Ci (cells/mL)	Criteri di validità secondo UNI EN ISO 8692			Tossico cieco RM065		
				□ Con 72 h	CV% Con 72 h	□ pH	mg ZnSO ₄ ·7H ₂ O L ⁻¹	IC 95%	
								LL	UL
1	A	CC	10000	1,88	0,07	-0,3	0,64	0,08	1,2
2	A	CC	9862	1,88	3,63	0,043	0,32	0,26	0,40
4	A	SP	10000	1,86	0,42	-0,2	0,44	0,34	0,54
5	A	CC	5000	1,67	1,26	0,02	0,62	0,53	0,72
6	A	SP	10000	1,80	0,83	0,8	0,36	0,29	0,43
7	AB (17.02.2016)	CC	9800	1,40	0,12	1,0	0,89	0,74	1,07
9	A	C	10000	1,48	4,10	0,55	0,36	0,32	0,39
11	A	C	10000	1,64	3,95	-0,85	0,38	0,07	0,68
14	A	CC	10000	1,50	0,61	0,41	0,16	0,13	0,20
15	AB (17.02.2016)	SP	10000	1,76	0,51	0,45	0,41	0,33	0,52
17	AB (01.11.2015)	CC	9789	1,52	3,13	0,6	0,66	0,36	0,97
19	AB (17.02.2016)	SP	25198	1,19	3,26	0,4	ND	ND	ND
22	NR	CC	10000	1,43	1,07	0,3	0,52	0,42	0,63

Abbreviazioni: A: allevamento; AB: Alginate Beads; C: Conta in camera; CC: Coulter Counter; Con: Controllo; CV: coefficiente di variazione; □pH: variazione del pH; IC: Intervallo di confidenza al 95%; LL: Low Limit (limite inferiore); □□□tasso di crescita□□ND: non□determinabile; SP: spettrofotometro; UL: Upper limit (limite superiore).

10. ISPRA IC038 “SAGGI DI TOSSICITÀ ACUTA CON DAPHNIA MAGNA SU TOSSICO CIECO”

Scopo	Valutazione dei risultati forniti dai partecipanti relativi alla determinazione dell'inibizione della mobilità della <i>Daphnia magna</i> per effetto di un tossico di riferimento ($K_2Cr_2O_7$) e di un tossico cieco.
Saggio	Tossicità acuta (24 h 48h) con organismi provenienti da forme criptobiotiche (uova durature o ephippi) e allevamento entrambi con tossico cieco e di riferimento
Tossico di riferimento	dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$)
Materiale di prova: Tossico cieco	1 unità di ISPRA RM074
Sistema di saggio	<i>Daphnia magna</i> provenienti da allevamenti presenti nel proprio laboratorio o da forme immobilizzate in matrice
Numero di Partecipanti	*30 ARPA/APPA
Dettagli dello studio	I parametri oggetto della prova valutativa relativo al saggio di tossicità acuta con <i>Daphnia magna</i> sono i seguenti: <ul style="list-style-type: none"> • per il tossico di riferimento: valore di $EC_{50-24 h}$, espresso in mg L⁻¹ di sale $K_2Cr_2O_7$, determinato secondo il metodo di calcolo in uso presso il laboratorio partecipante. • per il tossico cieco ISPRA RM074: <ul style="list-style-type: none"> ✓ valore di EC_{50-24h} e EC_{50-48h}, espresso in mg L⁻¹, determinato secondo il metodo di calcolo in uso presso il laboratorio partecipante; ✓ percentuale di immobilizzazione

*Alla prova valutativa hanno aderito 30 laboratori ARPA/APPA, ad ogni laboratorio è stato attribuito un codice identificativo, cui sono stati associati i risultati. (tabella 10.1).

10.1 Materiali

Materiale di prova – tossico cieco ISPRA RM074

Il tossico cieco ISPRA RM074 (TC) utilizzato per le prove ecotossicologiche con *Daphnia magna* è costituito da sale zinco solfato eptaidrato ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ultrapuro 99%, pH: 5(4,4-5,6), PM: 287,54.

Il tossico di riferimento (TR) per la prova ecotossicologica con *Daphnia magna* è costituito da sale dicromato di potassio $K_2Cr_2O_7$. Il materiale non è stato fornito dagli organizzatori della prova valutativa. Si sottolinea che il saggio con il TR viene proposto per avere indicazioni sulla sensibilità degli organismi e verificare quindi l'accettabilità dei risultati ottenuti dai laboratori partecipanti alla prova valutativa, così come prevedono le norme (vedi ad es. UNI EN ISO 6341).

10.2 Disegno Sperimentale

I partecipanti hanno presentato i risultati relativi al saggio di inibizione della mobilità con *Daphnia magna*:

- TR con determinazione dell' EC_{50-24h} . Questo saggio viene proposto per avere indicazioni sulla sensibilità degli organismi;
- ISPRA RM074, con determinazione dell' EC_{50-24h} e EC_{50-48h} ;
- ISPRA RM074, con determinazione della percentuale di immobilizzazione.

A tale scopo sono stati utilizzati organismi neonati di *Daphnia magna* di età inferiore alle 24 ore.

Il saggio con il tossico ISPRA RM074 per la determinazione di EC_{50-24h} e EC_{50-48h} si esegue a partire da una soluzione madre di 500 mg L⁻¹ di ISPRA RM074 che comporta due fasi:

- prova preliminare per determinare l'intervallo di concentrazioni (range-finding test) entro il quale deve essere eseguita la prova definitiva;

- prova definitiva per il calcolo della EC₅₀-24h e EC₅₀-48h individuando un numero di concentrazioni ≥ 5 .

La determinazione della percentuale di immobilizzazione è stata eseguita su due soluzioni distinte del tossico cieco:

- 70 mg L⁻¹ di ISPRA RM074
- 50 mg L⁻¹ di ISPRA RM074.

Il saggio con *Daphnia magna*, previa verifica da parte dei laboratori del rispetto dei criteri di validità del metodo da loro utilizzato (APAT IRSA-CNR 8020 B, UNI EN ISO 6341, OECD 202 altri metodi interni), è considerato valido dall'organizzatore se rispetta anche il seguente criterio di validità:

- Percentuale di immobilizzazione del controllo $\leq 10\%$.

10.2.1 Valori assegnati

Tutti i valori di EC₅₀, inviati dai laboratori, sono stati sottoposti al test per la verifica della normalità di Shapiro-Wilk, sono stati quindi trasformati in logaritmo base 10 secondo quanto riportato nel documento "Environment Canada, 2005".

Il valore assegnato di riferimento per ISPRA RM074 (EC₅₀-24h e EC₅₀-48 h) corrisponde al valore di consenso dei risultati delle misure dei laboratori partecipanti ed è ottenuto quale media robusta, anti-trasformata, dei valori logaritmici di EC₅₀.

A ciascun valore assegnato di riferimento sono associati un limite inferiore (Lim. Inf) e uno superiore (Lim. Sup.) di attenzione, pari, rispettivamente, al valore assegnato più o meno due volte il valore dello scarto tipo robusto del circuito ISPRA-IC038 espressi in forma anti-trasformata dei valori logaritmici. Lo scarto tipo robusto del circuito IC038, così come il valore assegnato, è ottenuto tramite un foglio di calcolo validato che sviluppa l'algoritmo A di statistica robusta sulla base dei valori logaritmici e successivamente anti-trasformato, secondo quanto riportato nel documento "Environment Canada, 2005".

Tabella 10.1– Laboratori ARPA/APPA che hanno restituito i risultati della prova valutativa ISPRA IC038

Ente
APPA Bolzano-Laboratorio biologico provinciale
APPA - Agenzia Prov.le per la Protezione dell'Ambiente - Settore Tecnico per la Tutela dell'Ambiente (Trento)
ARTA ABRUZZO Distretto Provinciale di L'AQUILA
ARTA ABRUZZO Distretto di Pescara
ARPAB - Dipartimento Provinciale di Potenza - Laboratorio di Microbiologia
ARPACAL Laboratorio Bionaturalistico Dipartimento Provinciale di Cosenza
ARPACAL Laboratorio Bionaturalistico Dipartimento Provinciale di Catanzaro
ARPACAL Laboratorio Bionaturalistico Dipartimento Provinciale di Reggio Calabria
ARPAE-ER Ferrara S.O. Ecotossicologia/Microbiologia
ARPAE-ER Ravenna Unità Operativa Biologia Ambientale
ARPAE-ER REGGIO EMILIA Area Microbiologia Laboratorio Integrato
ARPA FVG-Laboratorio di Udine – Sezione Microbiologia/Ecotossicologia
ARPA LAZIO - Sezione Prov.le di Latina - Servizio Risorse Idriche, Suolo, Rifiuti e Bonifiche
ARPA LOMBARDIA Laboratorio di Milano Sede Laboratoristica di Parabiago
ARPA LOMBARDIA Laboratorio di Brescia
ARPA MOLISE Dipartimento Campobasso
ARPA MOLISE Dipartimento Prov.le Isernia
ARPA Piemonte -Dipartimento Territoriale SUD-OVEST - Cuneo Laboratorio Specialistico Analisi Primarie
ARPA-PUGLIA Dipartimento Provinciale di BARI- Biologia delle Acque -Laboratorio di Ecotossicologia
ARPA-PUGLIA Dipartimento Provinciale di BRINDISI- Biologia delle Acque
ARPA-PUGLIA Dipartimento Provinciale di LECCE- Biologia delle Acque
ARPAS - Servizio RLMC Laboratorio Sassari
ARPAS - Servizio RLMC Laboratorio Cagliari
ARPA Sicilia - ST di Catania
ARPA Sicilia - ST di Palermo
ARPAT- UO BIOLOGIA AVC FIRENZE
ARPAT- UO BIOLOGIA AVL PISA
ARPA UMBRIA
ARPA VALLE D'AOSTA Laboratorio Chimico Biologico Microbiologico
ARPA VENETO laboratorio sede di Venezia -Mestre

10.3 Elaborazione statistica e criteri di valutazione dell'accettabilità dei risultati

I risultati dei laboratori partecipanti sono stati sottoposti ad una accurata verifica preliminare. La verifica ha riguardato la completezza delle informazioni inviate, propedeutiche all'elaborazione statistica, e la corrispondenza tra quanto dichiarato dai laboratori e quanto previsto dal protocollo del circuito. In alcuni casi si è resa necessaria una fase ulteriore di riscontro con i singoli laboratori al fine di acquisire integrazioni dei dati ricevuti.

Le prestazioni dei laboratori rispetto al tossico di riferimento TR (EC50-24h) sono state valutate graficamente rispetto all'intervallo dichiarato di accettabilità associato al tossico pari a (0,6 mg L⁻¹ – 2,1 mg L⁻¹). Tali prestazioni sono state valutate al solo fine di avere indicazioni sulla sensibilità degli organismi e verificare quindi l'accettabilità dei risultati ottenuti dai laboratori partecipanti alla prova valutativa

La valutazione dei dati di ciascun laboratorio per il tossico cieco è stata effettuata sulla base dei punteggi di z-score (z) calcolati secondo l'Equazione 1, in accordo a ISO 13528:2015 e ISO 17043:2010.

$$\text{(Equazione 1)} \quad z = \frac{X_{LAB} - X_{Rif}}{\hat{\sigma}}$$

dove:

- X_{LAB} = miglior stima (in base Log₁₀) riportata dal laboratorio, relativa alla proprietà di interesse;
- X_{Rif} = valore assegnato di riferimento (in base Log₁₀) della proprietà di interesse;
- $\hat{\sigma}$ = scarto tipo robusto del circuito (in base Log₁₀)

Sono adottati i seguenti criteri di accettabilità degli z-score:

	z	≤ 2	Accettabile
2 <	z	≤ 3	Discutibile
	z	> 3	Non Accettabile

10.4 Risultati

10.4.1 Partecipazione

Dei 32 laboratori delle ARPA/APPA che hanno inviato la scheda di adesione, 30 hanno restituito i risultati. Il 100% dei laboratori effettivamente partecipanti ha effettuato il saggio per la determinazione di EC₅₀-24h sia sul tossico di riferimento che sul tossico cieco ISPRA RM074, mentre 28 laboratori, pari a 93%, hanno effettuato il saggio per la determinazione di EC₅₀-48h sul tossico cieco ISPRA RM074, i laboratori che non hanno effettuato il test a 48h sono stati il numero 23 e il 25.

Per la determinazione della percentuale di immobilizzazione, sulle due soluzioni di tossico cieco ISPRA RM074, 27 laboratori pari al 90% hanno effettuato il saggio. I laboratori 06-17-30 non hanno effettuato il saggio.

10.4.2 Analisi dei risultati

Sono riportati in forma tabellare e in allegato al presente paragrafo (*Risultati delle misure dei laboratori, TC ISPRA RM074 e TR*), per ciascun saggio, i risultati delle misure ecotossicologiche inviati dai laboratori partecipanti alla prova in accordo alle richieste del protocollo. Nello specifico:

- TR con determinazione dell'EC₅₀-24h (Tabella 10.3);
- TC ISPRA-RM074, con determinazione dell'EC₅₀-24h e EC₅₀-48h (Tabella 10.4);
- TC ISPRA-RM074, con determinazione della percentuale di immobilizzazione su due soluzioni di ISPRA- RM074 (70 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹) (Tabella 10.5).

Dei laboratori, a cui spettava la verifica del rispetto dei criteri di validità del metodo da loro utilizzato, circa il 57% (17 laboratori) ha utilizzato il metodo UNI EN ISO 6341, il 43% (13 laboratori) il metodo APAT IRSA-CNR 8020 B (Tabella 10.6).

Per la prova su *Daphnia magna*, i laboratori sono stati lasciati liberi di utilizzare i propri sistemi di saggio. A tale proposito, 13 laboratori hanno impiegato allevamenti (A), 17 laboratori hanno utilizzato

forme criptobiotiche (E). In Tabella 10.7 è stato riportato il test di determinazione della percentuale di immobilizzazione sulle due soluzioni di TC ISPRA-RM074 e, per ciascun laboratorio, il metodo e il sistema di saggio utilizzati.

L'organizzatore ha potuto confermare dall'analisi dei dati pervenuti che per quanto riguarda l'EC₅₀-24h per il TR e l'EC₅₀-24 e 48h per il TC (ISPRA RM074 solfato di zinco eptaidrato) tutti i laboratori hanno ottenuto la percentuale di immobilizzazione del controllo ≤ 10%.

Mentre sono riportati sempre in forma tabellare (z-score), per ciascun laboratorio, i valori relativi agli z-score per EC₅₀ con TC ISPRA-RM074 a 24h e a 48h (Tabelle 10.8 e 10.9).

Nella Tabella 10.2 sono mostrati i valori assegnati di riferimento EC₅₀ (anti-logaritmo e logaritmo) con i rispettivi limiti di attenzione, per il tossico cieco RM074 (solfato di zinco eptaidrato, ZnSO₄·7H₂O) ottenuti nelle prove con il crostaceo *Daphnia magna*.

Tabella 10.2 – Valori assegnati di riferimento EC₅₀ per il TC nelle prove con *Daphnia magna*

Parametro	Tossico		n*	Valore assegnato	Lim. Sup	Lim. Inf
EC ₅₀ -24 h	TC (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	Anti-log (mg/L)	30	26,4	106,3	6,5
		Log ₁₀		1,4	2,0	0,8
EC ₅₀ -48 h	TC (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	Anti-log (mg/L)	28	7,4	22,4	2,4
		Log ₁₀		0,9	1,4	0,4

*n: numero di laboratori che hanno effettuato la prova

Nelle **Figure da 10.1 a 10.8** sono riportati in forma grafica i risultati della prova valutativa.

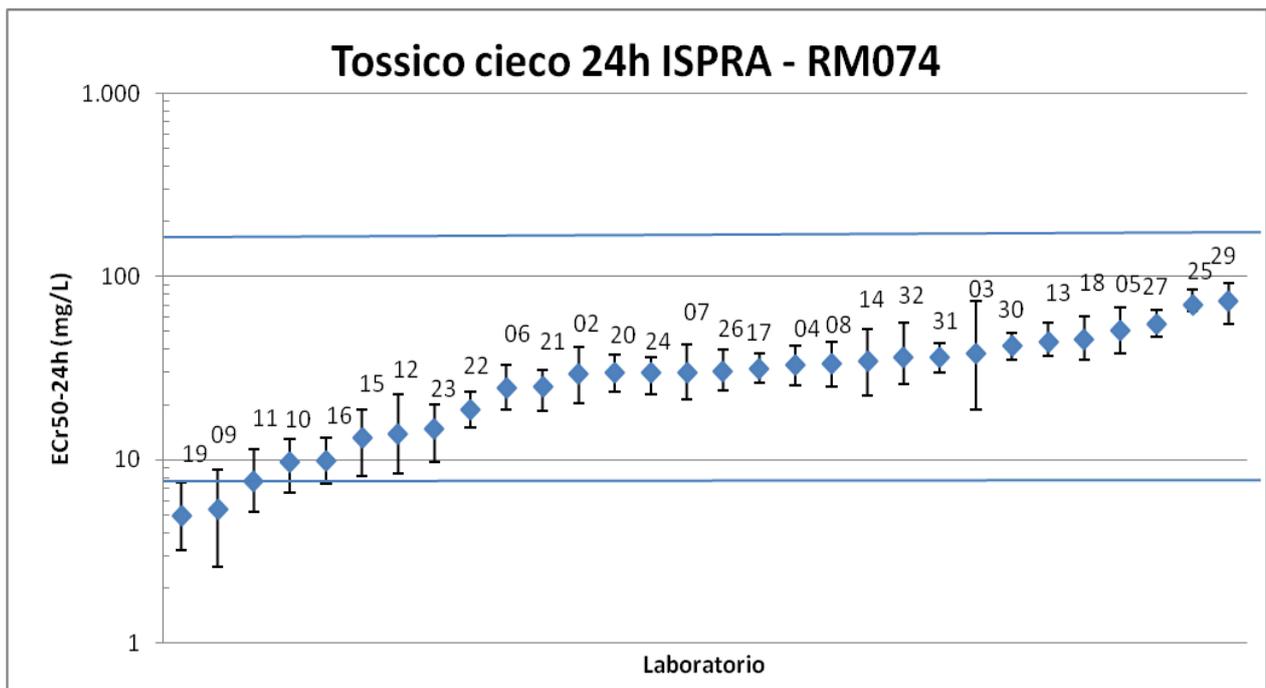


Figura 10.1 – Valori di EC₅₀ 24h (in scala logaritmica) ottenuti con il tossico cieco ISPRA RM074 (ZnSO₄·7H₂O). Le bande blu rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito)

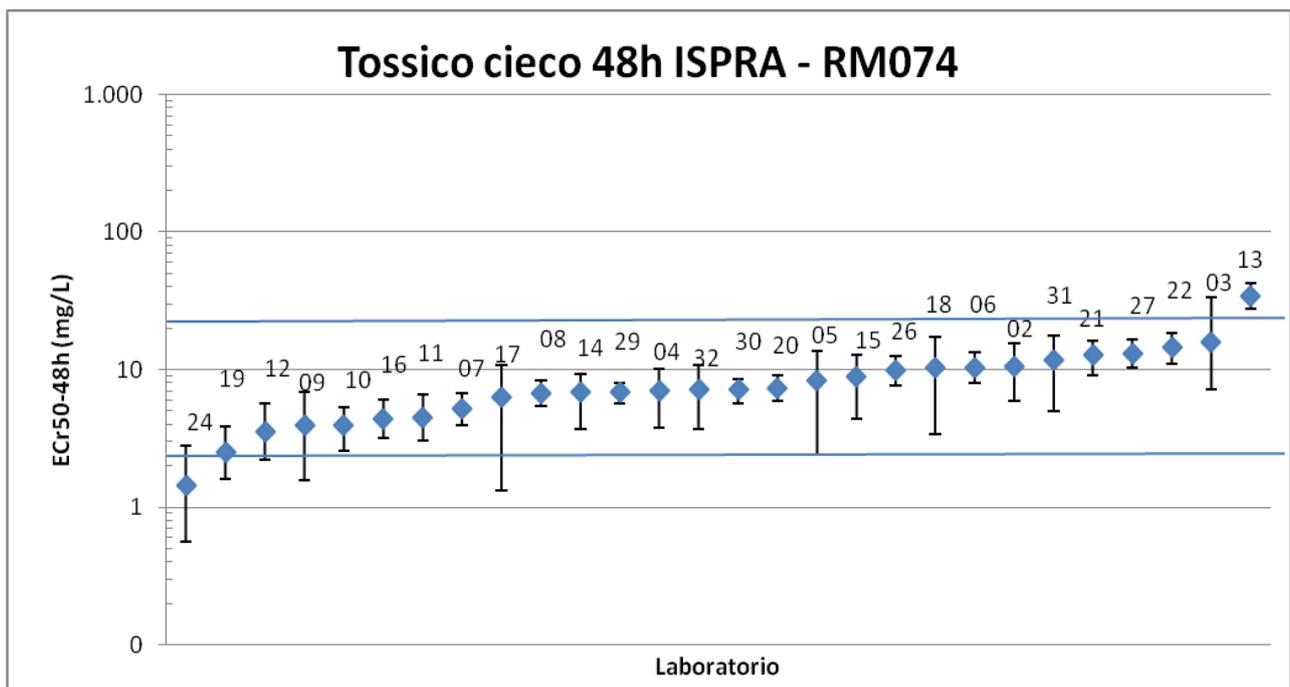


Figura 10.2 - Valori di EC₅₀ 48h (in scala logaritmica) ottenuti con il tossico cieco ISPRA RM074 (ZnSO₄·7H₂O). Le bande blu rappresentano i limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito)

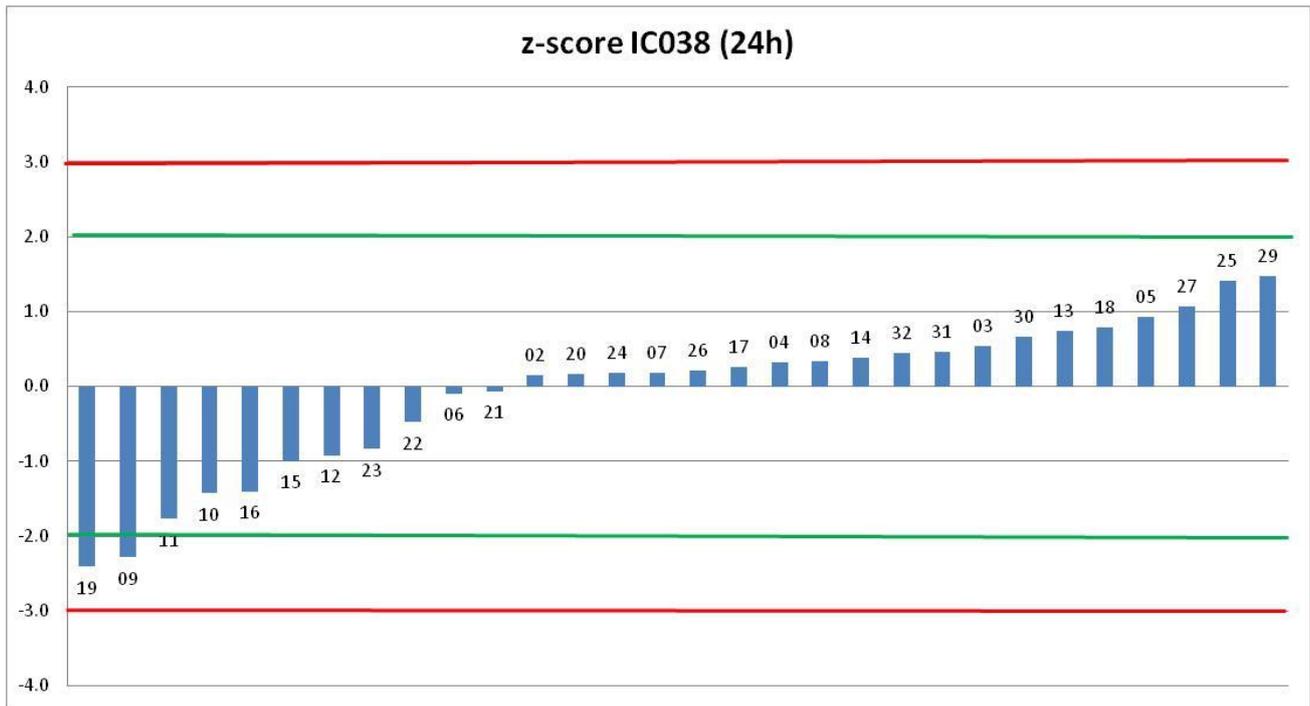


Figura 10.3 - Valori di z-score, per EC_{50} -24h con TC ISPRA-RM074

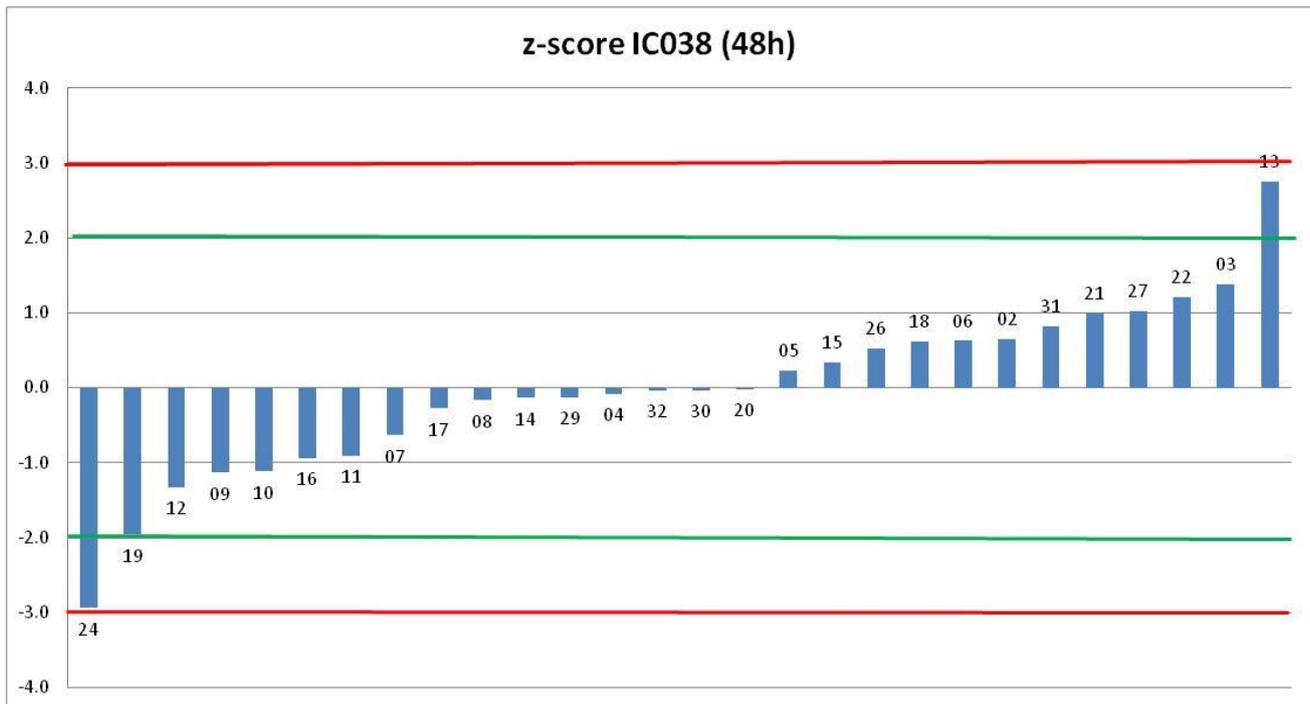


Figura 10.4 - Valori di z-score, per EC_{50} -48h con TC ISPRA-RM074

La prova valutativa in riferimento alla valutazione dei risultati associati alla percentuale di immobilizzazione di *Daphnia magna*, ha avuto esclusivamente un carattere sperimentale.

La necessità di esaminare tali risultati nasce dall'esigenza di una corretta valutazione dell'accettabilità di un effluente, come previsto dalla normativa vigente (Decreto Legislativo 152/2006). Nello specifico è prevista:

- Accettabilità delle acque di scarico (in acque superficiali, in fognatura e sul suolo) (Obbligatorio il saggio di tossicità acuta (24 h) con *Daphnia magna*)

- Classificazione della qualità dei corsi d'acqua: analisi supplementari sulla matrice acquosa (da effettuarsi a giudizio dell'autorità che effettua il monitoraggio in caso di degrado del corpo idrico) (Saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna*).

Di seguito i grafici (**Figura 10.5 e 10.6**) relativi ai risultati della percentuale di immobilizzazione (I%) su soluzioni a due diverse concentrazioni (50 mg L^{-1} e 70 mg L^{-1}) del tossico cieco ISPRA-RM074.

In **Figura 10.7** si può osservare, per ciascun laboratorio, un confronto diretto della percentuale di immobilizzazione tra le due diverse concentrazioni, con suddivisione per metodo utilizzato.

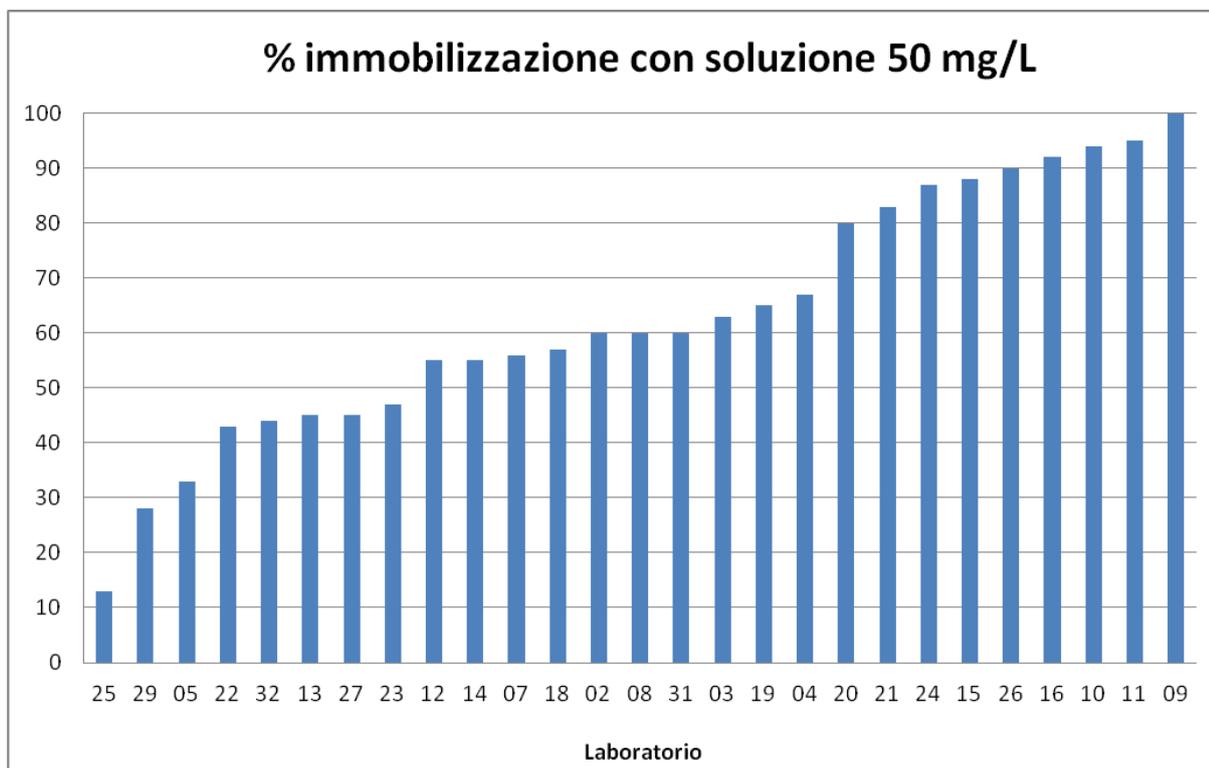


Figura 10.5 - Percentuale di immobilizzazione (%I) con soluzione mg L^{-1} di tossico cieco ISPRA-RM074

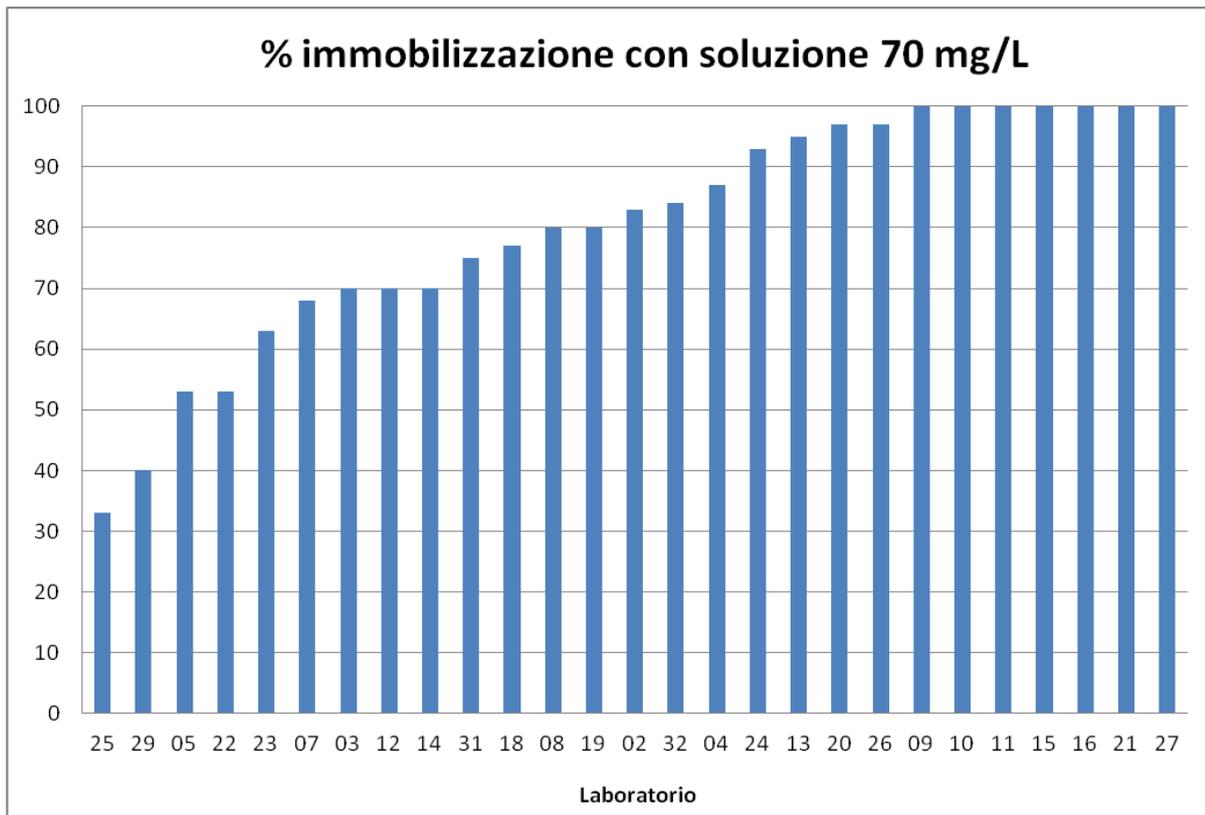


Figura 10.6 - Percentuale di immobilizzazione (%) con soluzione 70 mg L⁻¹ di Tossico cieco ISPRA-RM074

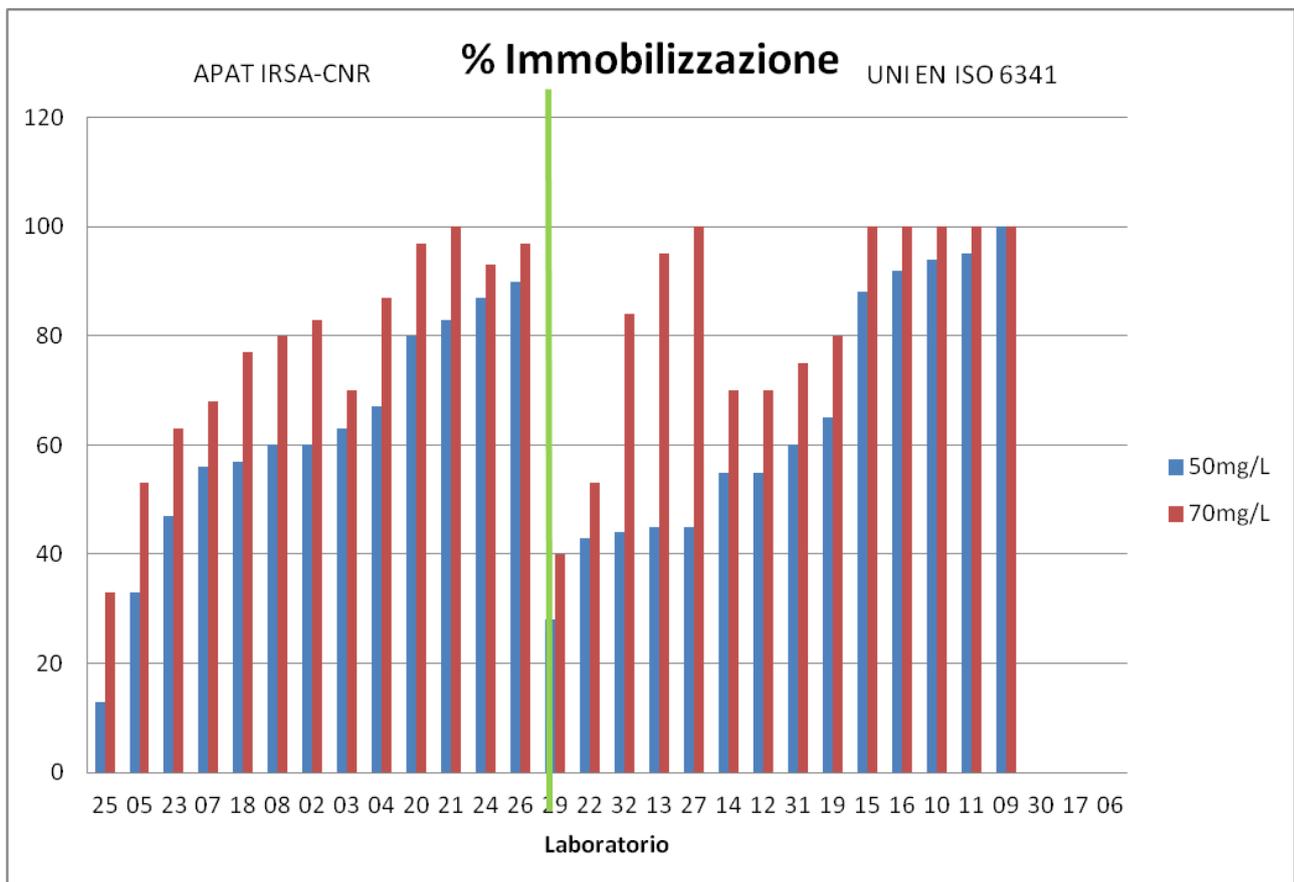


Figura 10.7- Confronto diretto, per ciascun laboratorio, della percentuale di immobilizzazione tra le due diverse concentrazioni, con suddivisione per metodo utilizzato

Di seguito (**Figura 10.8**) i risultati ottenuti dai laboratori sul tossico di riferimento (dicromato di potassio $K_2Cr_2O_7$) al fine di valutare la sensibilità degli organismi (da allevamenti e da forme criptobiotiche.) utilizzati nei test.

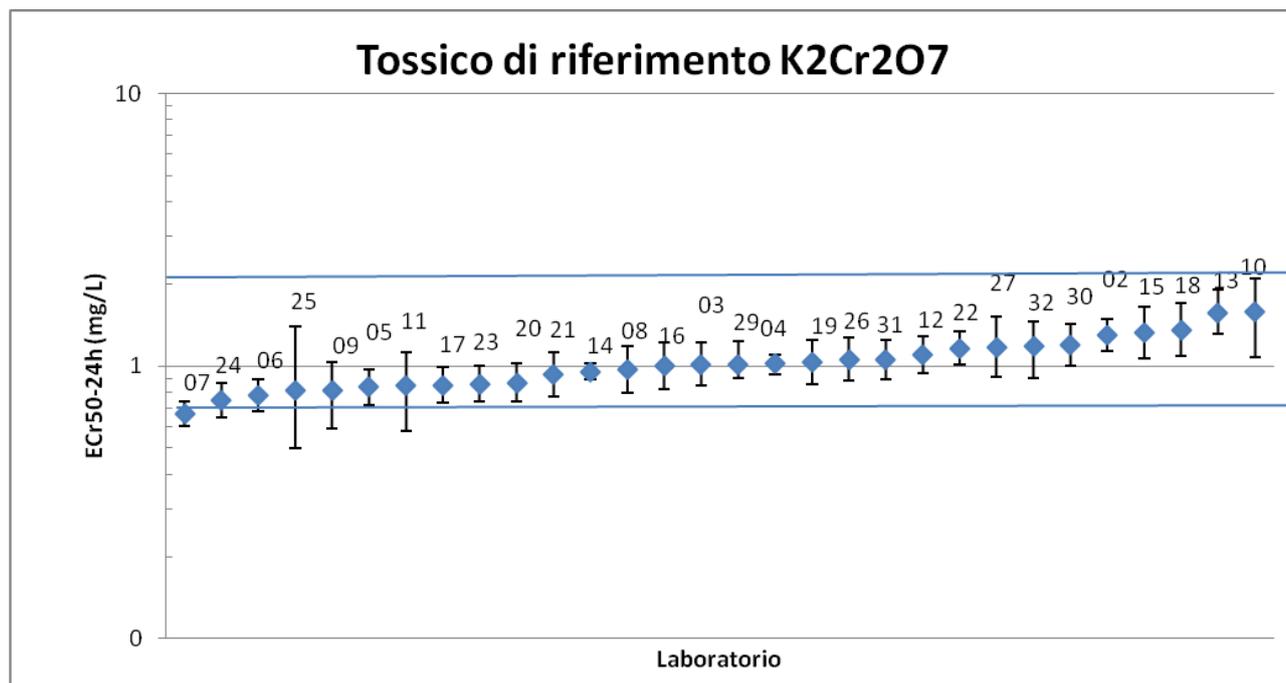


Figura 10.8 - Valori di EC_{50} 24h (in scala logaritmica) ottenuti con il tossico di riferimento ($K_2Cr_2O_7$). (Nota bene: i valori di EC_{50} 24h del tossico di riferimento variano tra $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,1 \text{ mg L}^{-1}$)

10.5 Conclusioni

La prova valutativa ISPRA IC038, organizzata dall'Area Metrologia di ISPRA, è stata finalizzata al confronto dei risultati di misure ecotossicologiche con *Daphnia magna* eseguite su materiali di prova da parte dei laboratori delle agenzie ARPA/APPA del Sistema Nazionale per la protezione dell'ambiente (SNPA) indicati dalla Rete dei Referenti a supporto dell'organizzazione dei circuiti interlaboratorio (RR 7.1 - Programmazione Triennale SNPA 2014-2016).

La presente prova valutativa ISPRA IC038 ha consentito, attraverso l'attribuzione di punteggi di z-score, di verificare le prestazioni dei laboratori in merito alle misure di EC_{50} a 24h e a 48h con tossico cieco (solfato di zinco eptaidrato).

La partecipazione dei laboratori ARPA/APPA alla prova ISPRA IC038, rispetto alle adesioni (30 su 32) può ritenersi più che positiva e si osserva, in generale, una corretta applicazione dei metodi di misura.

I valori di z-score per il tossico cieco sono molto soddisfacenti, in relazione allo scarto tipo della prova stessa.

La prova valutativa ha consentito di verificare il livello di dispersione tra laboratori dei risultati delle misure espressi in valore logaritmico, evidenziando una risposta confrontabile rispetto al criterio Environment Canada (CV% del 20% come valore "preferibile" di una serie di dati ecotossicologici). Nello specifico per il tossico cieco ISPRA RM074 i valori di CV percentuali ottenuti sono pari a:

- EC_{50} 24h CV% = 21,3%
- EC_{50} 48h CV% = 27,7%

I grafici mostrano che i risultati della maggioranza dei laboratori ricade all'interno dei limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito) indicando ulteriormente una complessiva idoneità delle misure eseguite dai laboratori nel contesto della prova ISPRA IC038 per il tossico cieco.

Il metodo APAT IRSA-CNR 8020 metodo B (Manuale 29/2003) prevede, ai fini del giudizio di accettabilità di un effluente, l'esecuzione del saggio con determinazione della percentuale di immobilizzazione (I%) di *Daphnia magna*. Nell'ambito della prova valutativa ISPRA IC038, i risultati delle percentuali di immobilizzazione sono stati trattati in via sperimentale e non sono stati oggetto di valutazioni statistiche.

Nel contesto delle misure ecotossicologiche, si sottolinea, ancora una volta, l'importanza dell'organizzazione e della partecipazione costante e assidua a prove valutative. L'esecuzione delle prove

valutative, attraverso lo strumento del confronto interlaboratorio, infatti, costituisce un elemento indispensabile per la valutazione esterna dell'affidabilità dei risultati analitici e per il miglioramento delle prestazioni di un laboratorio. La partecipazione a tali prove e le riunioni di confronto tecnico fra i partecipanti, agevola l'individuazione di possibili criticità e il miglioramento continuo delle prestazioni analitiche.

Si sottolinea, in particolare, che questo circuito interlaboratorio è stato utilizzato dall'Area di Metrologia per l'accreditamento presso Accredia dello schema per l'organizzazione di circuiti interlaboratorio sui saggi ecotossicologici.

Tabelle da 10.3 a 10.7: Risultati delle misure dei laboratori, TC ISPRA RM074 e TR

Tabella 10.3 – *Risultati della determinazione dell'EC₅₀-24h con TR e relativo intervallo di confidenza*

LAB	Determinazione EC ₅₀ con TR dicromato di potassio (K ₂ Cr ₂ O ₇)		
	EC ₅₀ -24h (mg L ⁻¹)	(intervallo di confidenza IC 95%) mg L ⁻¹	
02	1,30	1,14	1,48
03	1,01	0,85	1,22
04	1,02	0,93	1,10
05	0,84	0,72	0,97
06	0,78	0,68	0,89
07	0,67	0,60	0,74
08	0,97	0,80	1,18
09	0,82	0,59	1,03
10	1,58	1,08	2,09
11	0,85	0,58	1,12
12	1,10	0,94	1,28
13	1,56	1,31	1,90
14	0,95	0,89	1,02
15	1,32	1,07	1,65
16	1,00	0,82	1,22
17	0,85	0,73	0,99
18	1,36	1,09	1,70
19	1,03	0,86	1,25
20	0,87	0,74	1,03
21	0,93	0,77	1,12
22	1,16	1,01	1,34
23	0,86	0,74	1,00
24	0,75	0,65	0,86
25	0,81	0,50	1,40
26	1,06	0,88	1,27
27	1,17	0,91	1,52
29	1,01	0,90	1,23
30	1,19	1,00	1,43
31	1,06	0,89	1,25
32	1,18	0,90	1,46

Tabella 10.4 – Risultati della determinazione dell' EC_{50} -24h e 48h con TC ISPRA-RM074 con i relativi intervalli di confidenza

Determinazione EC_{50} con Tossico cieco ISPRA-RM074

LAB	EC_{50} -24h (mg L ⁻¹)	(intervallo di confidenza IC 95%) mg L ⁻¹ 24 h		EC_{50} -48h (mg L ⁻¹)	(intervallo di confidenza IC 95%) mg L ⁻¹ 48 h	
02	29,20	20,20	41,30	10,60	5,90	15,50
03	38,25	18,66	74,05	15,91	7,18	33,19
04	32,93	25,41	41,86	7,04	3,77	10,16
05	50,55	38,33	67,99	8,40	2,42	13,71
06	24,57	18,89	32,67	10,44	8,00	13,40
07	29,98	21,41	42,89	5,19	3,92	6,69
08	33,30	25,20	44,00	6,74	5,41	8,41
09	5,37	2,63	8,84	3,94	1,56	6,88
10	9,76	6,63	12,89	3,97	2,59	5,35
11	7,68	5,16	11,44	4,47	3,05	6,55
12	13,85	8,37	22,91	3,54	2,22	5,62
13	44,23	36,83	55,56	33,97	27,91	42,63
14	34,46	22,48	51,69	6,85	3,70	9,35
15	13,11	8,12	18,73	8,88	4,43	12,91
16	9,89	7,45	13,13	4,39	3,15	6,11
17	31,58	26,11	37,92	6,32	1,33	10,77
18	45,55	34,88	60,94	10,36	3,39	17,34
19	4,92	3,20	7,56	2,49	1,60	3,89
20	29,68	23,48	37,30	7,33	5,94	9,06
21	25,12	18,54	30,92	12,78	9,16	16,05
22	18,91	14,98	23,50	14,44	11,07	18,29
23	14,73	9,79	19,87			
24	29,86	22,84	36,05	1,45	0,56	2,82
25	70,51	65,09	84,39			
26	30,51	23,97	40,23	9,87	7,60	12,59
27	55,48	46,72	65,88	12,98	10,24	16,44
29	73,60	55,40	91,80	6,87	5,69	8,05
30	41,86	35,02	49,24	7,25	5,66	8,56
31	36,25	30,00	43,40	11,65	5,00	17,50
32	36,10	25,68	55,59	7,23	3,72	10,68

Tabella 10.5 – Risultati della determinazione della Percentuale di immobilizzazione (%I) con TC ISPRA-RM074

LAB	Determinazione della Percentuale di immobilizzazione (%I) con TC ISPRA-RM074	
	I% con soluz. [50 mg L ⁻¹]	I% con soluz. [70 mg L ⁻¹]
02	60,00	83,00
03	63,00	70,00
04	67,00	87,00
05	33,00	53,00
06		
07	56,00	68,00
08	60,00	80,00
09	100,00	100,00
10	94,00	100,00
11	95,00	100,00
12	55,00	70,00
13	45,00	95,00
14	55,00	70,00
15	88,00	100,00
16	92,00	100,00
17		
18	57,00	77,00
19	65,00	80,00
20	80,00	97,00
21	83,00	100,00
22	43,00	53,00
23	47,00	63,00
24	87,00	93,00
25	13,00	33,00
26	90,00	97,00
27	45,00	100,00
29	28,00	40,00
30		
31	60,00	75,00
32	44,00	84,00

Tabella 10.6 – *Criteria di validità previsti dal metodo usato dai laboratori*

	Metodo	
	UNI EN ISO 6341	Metodo APAT IRSA-CNR 8020
Criteria validità	I% controllo $\leq 10\%$ EC ₅₀ Dicromato di potassio 0,6 - 2,1 mg L ⁻¹	Valido per metodo A e B. Il saggio va ripetuto se, al termine delle 24 h: a) nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano il 10% ; b) in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione O ₂ risulterà inferiore a 2 mgL ⁻¹

Tabella 10.7 – Associazione, per ciascun laboratorio, del metodo e del sistema di saggio utilizzati per la determinazione della % di immobilizzazione su soluzioni di TC ISPRA- RM074

LAB	Sistema di saggio	Metodo	Determinazione della Percentuale di immobilizzazione (%I) su soluzioni di Tossico cieco ISPRA-RM074	
			I% [50 mg L ⁻¹]	I% [70 mg L ⁻¹]
02	A	APAT IRSA-CNR	60,00	83,00
03	A	UNI EN ISO 6341/APAT IRSA-CNR	63,00	70,00
04	A	APAT IRSA-CNR	67,00	87,00
05	A	APAT IRSA-CNR	33,00	53,00
06	A	UNI EN ISO 6341		
07	A	APAT IRSA-CNR	56,00	68,00
08	A	APAT IRSA-CNR	60,00	80,00
09	E	UNI EN ISO 6341	100,00	100,00
10	E	UNI EN ISO 6341	94,00	100,00
11	E	UNI EN ISO 6341	95,00	100,00
12	E	UNI EN ISO 6341	55,00	70,00
13	E	UNI EN ISO 6341	45,00	95,00
14	A	UNI EN ISO 6341	55,00	70,00
15	E	UNI EN ISO 6341	88,00	100,00
16	E	UNI EN ISO 6341	92,00	100,00
17	A	UNI EN ISO 6341		
18	A	APAT IRSA-CNR	57,00	77,00
19	E	UNI EN ISO 6341	65,00	80,00
20	E	APAT IRSA-CNR	80,00	97,00
21	E	APAT IRSA-CNR	83,00	100,00
22	E	UNI EN ISO 6341	43,00	53,00
23	A	APAT IRSA-CNR	47,00	63,00
24	A	APAT IRSA-CNR	87,00	93,00
25	E	APAT IRSA-CNR	13,00	33,00
26	A	APAT IRSA-CNR	90,00	97,00
27	E	UNI EN ISO 6341	45,00	100,00
29	E	UNI EN ISO 6341	28,00	40,00
30	E	UNI EN ISO 6341		
31	E	UNI EN ISO 6341	60,00	75,00
32	E	UNI EN ISO 6341	44,00	84,00

A:allevamento E:Ephippia

Tabelle z-score

Tabella 10.8 - Valori di z-score, per EC_{50} con TC ISPRA-RM074 a 24h, di ciascun laboratorio

LAB	z-score
2	0,1
3	0,5
4	0,3
5	0,9
6	-0,1
7	0,2
8	0,3
9	-2,3
10	-1,4
11	-1,8
12	-0,9
13	0,7
14	0,4
15	-1,0
16	-1,4
17	0,3
18	0,8
19	-2,4
20	0,2
21	-0,1
22	-0,5
23	-0,8
24	0,2
25	1,4
26	0,2
27	1,1
29	1,5
30	0,7
31	0,5
32	0,5

Tabella 10.9 - Valori di z-score, per EC_{50} con TC ISPRA-RM074 a 48h, di ciascun laboratorio

LAB	z-score
2	0,7
3	1,4
4	-0,1
5	0,2
6	0,6
7	-0,6
8	-0,2
9	-1,1
10	-1,1
11	-0,9
12	-1,3
13	2,8
14	-0,1
15	0,3
16	-0,9
17	-0,3
18	0,6
19	-2,0
20	0,0
21	1,0
22	1,2
24	-2,9
26	0,5
27	1,0
29	-0,1
30	0,0
31	0,8
32	0,0

10.6.Riferimenti

- ASTM E691-1999 “Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method”.
- UNI EN ISO IEC 17043:2010 Valutazione della conformità. Requisiti generali per prove valutative interlaboratorio.
- Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests. Environment Canada Report EPS 1/RM/46 March 2005 (with June 2007 amendments).
- ISO 13528:2015 “Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison”.
- UNI EN ISO 6341: 2013 Qualità dell’acqua – Determinazione dell’inibizione della mobilità di *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Prova di tossicità acuta.
- APAT IRSA–CNR 8020 metodo B (Manuale 29/2003).
- Metodo OECD Guideline n. 202 (2004).

11. CONCLUSIONI

La rassegna ha presentato il lavoro svolto, negli anni 2003-2016, da ISPRA, prima dall'ex Servizio di Metrologia Ambientale e attualmente dall'Area di Metrologia nel Centro Nazionale per la rete Nazionale dei Laboratori, come organizzatore di prove valutative interlaboratorio di tipo ecotossicologico. Sistema Nazionale delle Agenzie Ambientali (SNPA).

L'opportunità di potere lavorare a rete, mettendo in campo tutte le competenze disponibili attraverso uno scambio e confronto tecnico continuo fra i partecipanti, agevola il miglioramento delle prestazioni e l'individuazione di eventuali criticità oltre a permettere un continuo adeguamento dei saggi alle richieste legislative di monitoraggio tramite i saggi ecotossicologici. Nella tabella 11.1 è presentato un confronto riassuntivo delle principali informazioni caratterizzanti le diverse prove valutative.

Con riferimento alla tipologia dei partecipanti si nota come a partire dal 2005 al 2008 c'è un progressivo aumento del numero di laboratori delle Agenzie e una diminuzione significativa di quelli di Istituzioni private. La flessione che si registra dal 2008 del numero di laboratori del SNPA che hanno partecipato ai confronti interlaboratorio sembra di poter ipotizzare che sia dovuta all'effetto dei nuovi assetti organizzativi dei laboratori nelle singole Agenzie in un ottica di razionalizzazione degli stessi, o anche alla tipologia di prove organizzate da ISPRA con una maggiore numerosità di saggi richiesti (Ad esempio in SC007 erano state richieste 5 prove con 2 organismi differenti).

Si osserva in generale, una corretta applicazione dei metodi di esecuzione dei saggi ecotossicologici da parte dei laboratori con percentuali molto elevate (mai inferiori al 90%) di rispetto dei criteri di validità prescritti dai saggi stessi o prescritti specificatamente nei protocolli stabiliti per le prove.

Con riferimento alla valutazione delle prestazioni dei laboratori, questa è stata condotta utilizzando lo scarto tipo dei risultati dei partecipanti stessi per i circuiti APAT IC006, APAT IC012, ISPRA IC020 e ISPRA IC038, ed è risultata sempre molto buona.

Nel prossimo futuro si potrebbe valutare l'opportunità di definire, insieme alla rete dei referenti, uno scarto tipo obiettivo dei Laboratori del SNPAd per i saggi ecotossicologici come ulteriore sfida verso il miglioramento e l'armonizzazione delle prestazioni dei laboratori a livello nazionale. Inoltre sono state evidenziate alcune problematiche aperte nel metodo APAT IRSA-CNR 8020 metodo B (Manuale 29/2003) che prevede, ai fini del giudizio di accettabilità di un effluente, l'esecuzione del saggio con determinazione della percentuale di immobilizzazione (I%) di *Daphnia magna*. L'esigenza di disporre di una procedura che risolva le problematiche aperte suggerisce la necessità di organizzare uno studio collaborativo definendo, a priori, una procedura condivisa. L'esperienza maturata in quest'anni come organizzatori di circuiti ha permesso ad ISPRA di ottenere l'accreditamento per l'organizzazione di prove valutative per i saggi ecotossicologici all'interno del Centro PTP n. 10, secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043 "Valutazione della conformità Requisiti generali per prove valutative interlaboratorio".

In merito al tema dell'accreditamento (UNI EN ISO/IEC 17025), che nasce specificatamente per le prove di tipo chimico, molti esperti sottolineano da tempo la necessità di una disamina approfondita degli aspetti peculiari dell'accreditamento dei saggi ecotossicologici che, sebbene puntualmente affrontati da molti laboratori ARPA accreditati, richiedono, tuttavia, un'armonizzazione maggiore. La differenza tra il "linguaggio chimico" e il "linguaggio biologico", la variabilità nel tempo degli organismi di saggio, le fonti di incertezza dei diversi metodi ecotossicologici, la convalida dei metodi non normalizzati, costituiscono alcune delle problematiche rilevate. A tale scopo, è stato di recente avviato un Gruppo di Lavoro ad hoc ISPRA-ACCREDIA-ARPA/APPA per studiare e discutere le criticità del percorso di accreditamento delle prove ecotossicologiche, con l'obiettivo di produrre un documento finale "di indirizzo" per gli utilizzatori che vorranno usufruirne.

Tabella 11.1 - Confronto riassuntivo delle principali informazioni caratterizzanti le diverse prove valutative

II Interconfronto Nazionale	APAT IC006	APAT IC012	ISPRA IC020	ISPRA SC007	ISPRA IC038	
Anno di esecuzione	2003	2005	2008	2011	2014	2016
Organizzazione	APAT - CNR ISE	APAT-ARPAV	APAT (GTP)	ISPRA	ISPRA	ISPRA
N° Laboratori aderenti	76	74	59	44	25	32
N° Laboratori che hanno restituito i risultati	49 L _{KIT} ^a 14 L _{AL} ^b -	36 L _{KIT} 29 L _{AL} 5 L _{KIT} + L _{AL} ^c	22 L _{KIT} 26 L _{AL} -	36 M 6 L -	23 ^d	30
Organismo/i	<i>D. magna</i>	<i>D. magna</i>	<i>D. magna</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>D. magna</i> <i>P. subcapitata</i>	<i>D. magna</i>
Campione/i di prova	K ₂ Cr ₂ O ₇	K ₂ Cr ₂ O ₇ KCl	K ₂ Cr ₂ O ₇ APAT-RM015 ^e	K ₂ Cr ₂ O ₇ CdCl ₂ ·2,5H ₂ O	ISPRA RM050 ^f (+ tossici di riferimento)	ISPRA RM074 (+ tossici di riferimento)
Misure richieste ai laboratori	EC ₅₀ -24 h	EC ₅₀ -24 h	EC ₅₀ -24 h	EC ₅₀ -5/15/30 min	% immobili 24 e 48 h Ir % 72 h	% immobili su TC EC ₅₀ -24 h e 48h TC; EC ₅₀ -24 h TR
Criterio di valutazione delle prestazioni dei lab.	NE	z-score	Valore di riferimento assegnato per l'EC ₅₀	Valore di riferimento assegnato per l'EC ₅₀	NA	Percentuale di immobilizzazione del controllo ≤ 10%.
Lab. che hanno rispettato i criteri di validità del saggio/i ecotossicologico (%)	95%	95%	100%	93%	<i>D. magna</i> 96% <i>P. subcapitata</i> 91%	<i>D. magna</i> 100%

Abbreviazioni: GTP: Gruppo Tecnico Permanente; Ir: inibizione di crescita; L: Lumistock; M: Microtox; NA: non applicabile; NE: non effettuato

Note: ^a 28 sono laboratori ARPA/APPA e 21 sono laboratori di altre Istituzioni; ^b Nel presente documento non sono stati presi in considerazione i dati riguardanti L_{AL};

^c Laboratori che hanno utilizzato sia organismi d'allevamento (AL) che organismi da forme criptobiotiche (KIT); ^d 20 laboratori ARPA/APPA e 3 laboratori di altre Istituzioni.

Per la *D. magna*: 13 L_{AL}, 9 L_{KIT} e 1 non riportato; per *P. subcapitata*: 12 L_{AL}, 10 L_{KIT} e 1 non riportato; ^e suolo contaminato; ^f rifiuto

TR:tossico di riferimento; TC:tossico cieco

